

Eigenschaften *late-stage*-modifizierter Kollagen- Modellpeptide

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
CHRISTOPH PRIEM, B. Sc.
aus Georgsmarienhütte

Marburg/Lahn 2019

Erstgutachter: Prof. Dr. ARMIN GEYER
Zweitgutachter: Jun.-Prof. Dr. OLALLA VÁZQUEZ
Hochschulkennziffer: 1180

Dissertation angenommen am: 21.11.2019; Tag der mündlichen Prüfung: 25.11.2019

Am Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg

als Dissertation angenommen am: 21.11.2019

Erstgutachter: Prof. Dr. ARMIN GEYER

Zweitgutachter: Jun.-Prof. Dr. OLALLA VÁZQUEZ

Tag der mündlichen Prüfung: 25.11.2019

Hochschulkennziffer: **1180**

Der experimentelle Teil dieser Arbeit entstand in der Zeit von April 2015 bis April 2019 am Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg

Mein besonderer Dank gilt

Prof. Dr. Armin Geyer

für die große wissenschaftliche Freiheit bei der Bearbeitung dieser sehr komplexen und außerordentlich spannenden Thematik sowie die stets hervorragende Unterstützung und Hilfestellung.

Kurzzusammenfassung

Natürliches Kollagen ist ein posttranslational hochmodifiziertes Strukturprotein. Der Einfluss spezifischer Modifikationen auf die tripelhelikale Struktur wird mittels Kollagen-Modellpeptiden untersucht. Mittels optimierter Festphasen-Peptidsynthese wurden Modellpeptide dargestellt welche, ähnlich einer posttranslationalen Modifikation, diastereoselektiv dihydroxyliert werden konnten. Hier konnte ein Zusammenhang zwischen Hydroxylierungsgrad, Konformation des dihydroxylierten Prolinrings und Stabilität der gebildeten Tripelhelix, welche mittels NMR-spektroskopischer Methoden quantifiziert wurde, beobachtet werden.

Eine Diolstruktur, welche in der Lage ist Boronsäuren bzw. Benzoboroxole reversibel zu binden, wurde zudem genutzt um ein Benzoboroxol-modifiziertes Kollagen-Modelpeptid zu verknüpfen. Dies ist zudem das erste Beispiel für eine kovalent reversibel verknüpfte (*capped*) Kollagen-Tripelhelix. Verschiedene *cap*-Strukturen führten in allen Fällen zu einer Stabilisierung der tripelhelikalen Struktur. Eine Modulierung der Ladungsstruktur führte zudem zu verschiedenen supramolekularen Aggregaten. Diese Aggregation reichte von löslichen Aggregaten mit schmaler bzw. breiter Größenverteilung, bis hin zu unlöslichen Aggregaten.

Durch Untersuchungen hinsichtlich der Fähigkeit zur Fällung von Kieselsäure, über die für Kollagen-Modelpeptide nur wenig bekannt ist, konnte in dieser Arbeit ein Zusammenhang zwischen Ladungsstruktur bzw. Aggregation und der Kieselsäurefällung hergestellt werden. Dies stellt einen deutlichen Fortschritt in der Synthese organisch-anorganischer-Hybridmaterialien auf Basis von Kollagen dar.

Abstract

Natural collagen is a posttranslational highly modified Scleroprotein. The influence of specific modification on the triplehelical structure was investigated with collagen model peptides. These model peptides were synthesized using an optimized solid phase peptide synthesis protocol and dihydroxylated diastereoselectively, similar to a posttranslational modification. A correlation between Hydroxylation pattern, conformation of the pyrrolidine and stability of the triple helical structure, determined with NMR-spectroscopical methods, was observed.

A 1,2-diol, able to bind boronic acid or benzoboroxoles reversibly, was used to link the three single strands of a benzoboroxole modified collagen model peptide. This is the first example of a covalent reversible capped collagen triple helix. Different cap-structures led to a stabilization of the triple helical structure in all cases. A variation of the charge pattern led to the formation of different supramolecular aggregates. Soluble aggregates with broad or narrow size distribution as well as insoluble aggregates were observed.

The ability of precipitating silica of collagen model peptides is only little investigated. In this work, a link between aggregation or charge pattern and the ability of silica precipitation was observed. This is a significant progress in the synthesis of organic-inorganic-hybrid material based on collagens.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Christoph Priem, André Wuttke, Marina Berditsch, Anne S. Ulrich, Armin Geyer

Scaling the Amphiphilic Character and Antimicrobial Activity of Gramicidin S by Dihydroxylation or Ketal Formation.

J. Org. Chem. **2017**, 82, 12366-12376.

DOI: 10.1021/acs.joc.7b02177

Christoph Priem, Armin Geyer

Synthetic Marine Sponge Collagen by Late-Stage Dihydroxylation

Org. Lett. **2018**, 20, 162-165.

DOI: 10.1021/acs.orglett.7b03525

Christoph Priem, Armin Geyer

Reversible covalent end-capping of collagen model peptides

Chem. Eur. J. **2019**, Accepted Manuscript

DOI: 10.1002/chem.201903460

Teile dieser Arbeit wurden bereits bei folgenden Veranstaltungen vorgestellt:

Poster: „*Dihydroxylated Gramicidin S Derivatives - Antimicrobial Properties*“

Erlangen, 13th German Peptide Symposium; 20.-23. März **2017**.

Poster: „*Late Stage Modification and N-Terminal Capping of the Collagen Triple Helix*“

Berlin, 21. ORCHEM Lecture Conference; 10.-12. September **2018**.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Kollagen	1
1.1.1. Struktur und Biosynthese	1
1.1.2. Stabilität der Tripelhelix	4
1.1.3. NMR-Spektroskopie mit Kollagenen.....	5
1.1.4. Modifikationen des Einzelstrangs	6
1.1.5. Verknüpfung von Einzelsträngen.....	9
1.2. Boronsäuren	13
1.2.1. Benzoboroxol als Diolbinder	14
1.2.2. Selbstassemblierung mit Boronsäuren	16
1.3. Kieselsäure	18
1.3.1. Biomineralisierung	19
1.3.2. Kollagen-Silica-Hybridmaterialien.....	20
2. Aufgabenstellung.....	22
3. Ergebnisse und Diskussion	24
3.1. Modifikationen des Kollageneinzelstrangs	24
3.1.1. Synthese der PUG-Repetiereinheit und optimierte SPPS	25
3.1.2. Charakterisierung von Kollagen-Modellpeptiden	31
3.1.3. Synthese eines Dihydroxyprolin-Derivats für die SPPS.....	36
3.1.4. Synthese eines geeigneten Vorläufer für die <i>late-stage</i> Dihydroxylierung	41
3.1.5. Dihydroxylierung von Kollagen-Ausschnitten	49
3.1.6. Synthese und Dihydroxylierung von Dehydroprolin-haltigen Kollagen- Modellpeptiden	56
3.1.7. Einfluss der Dihydroxyfunktion auf die Schmelztemperatur.....	64
3.1.8. Einfluss von Konformation und Polarität von Dihydroxyprolin auf die biologische Aktivität am Beispiel von Gramacidin S	69

Inhaltsverzeichnis

3.1.9. <i>Late-stage</i> Dihydroxylierung am Beispiel eines Gramacidin S-Derivates .	75
3.2. Modifikationen der Kollagen-Tripelhelix durch <i>capping</i>	77
3.2.1. Synthese eines Benzoboroxol-modifizierten Kollagen-Modellpeptids.....	78
3.2.2. Wahl einer geeigneten 1,2-Diolstruktur zum kovalent reversiblen <i>capping</i>	82
3.2.3. Struktur möglicher <i>caps</i> und deren Synthese.....	86
3.2.4. Kovalent reversibles <i>capping</i> einer Kollagen-Tripelhelix	93
3.2.5. Einfluss des <i>cappings</i> auf die Schmelztemperatur der Kollagen-Tripelhelix	96
3.2.6. Einfluss von positiven Permanentladungen am Kollagen Einzelstrang auf das <i>capping</i>	101
3.2.6.1. C-terminale Modifikationen	102
3.2.6.2. Einfluss der Kettenlänge auf die Niederschlagsbildung.....	106
3.2.6.3. Modifikationen am N-Terminus.....	110
3.2.6.4. Änderung des Aggregationsgrades durch <i>capping</i>	112
3.3. Kieselsäurefällung mit Kollagen-Modellpeptiden.....	118
3.3.1. Das Fällungsprotokoll	119
3.3.2. Synthetisches LCPA.....	120
3.3.3. Kovalent irreversibel <i>capped</i> Kollagen-Modellpeptiden	122
3.3.4. Ungeladene Kollagen-Modellpeptide mit unterschiedlichem Hydroxylierungsgrad.....	125
3.3.5. Einfluss eines kovalent reversiblen <i>cappings</i>	126
3.3.6. Einfluss von Ladung und Aggregation	129
4. Zusammenfassung	132
5. Ausblick	135
6. Summary	137
7. Outlook	140
8. Experimenteller Teil	141

Inhaltsverzeichnis

8.1. Allgemeine Hinweise	141
8.2. Allgemeine Hinweise für die Peptidsynthese	144
8.3. Allgemeine Arbeitsvorschriften	150
8.3.1. Kieselsäurefällung und –quantifizierung	150
8.3.2. Schmelzpunktbestimmung mittels NMR-Spektroskopie	150
8.3.3. Bestimmung des Aggregationsgrades	151
8.4. Darstellung der Verbindungen	152
Literaturverzeichnis	244
Anhang	268
Danksagung	308

Abkürzungen

2-CTC	2-Chlortritylchlorid
Å	Ångström
A _β	Amyloid β-Peptid
Ac	Acetyl
Ac ₂ O	Essigsäureanhydrid
AIBN	Azobis(isobutyronitril)
aq	wässrig
Äq.	Äquivalente
ar	aromatisch
ber.	Berechnet
Bn	Benzyl
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
Boc ₂ O	Di- <i>tert</i> -butyldicarbonat
<i>brsm</i>	<i>Based on Recovered Starting Material</i> (Bezogen auf reisoliertes Edukt)
°C	Grad Celsius
Cbz	Benzyloxycarbonyl
CD	Circulardichroismus
COSY	Correlated Spectroscopy (Korrelations-Spektroskopie)
δ	chemische Verschiebung
d	<i>day</i> (Tag)/ Durchmesser/ Dublett
DAD	Diodenarray-Detektor
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
dd	Doppeldublett
(DHDQ) ₂ Phal	Hydroquinidin-1,4-phthalazindiyl-diether
DIC	<i>N,N'</i> -Di- <i>iso</i> -propylcarbodiimid
DIPEA	Di- <i>iso</i> -propylethylamin

Abkürzungen

DMAP	<i>N,N</i> -Dimethylaminopyridin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMP	2,2-Dimethoxypropan
DMSO	Dimethylsulfoxid
dppf	1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocen
ESI	Elektrospray-Ionisation
Et	Ethyl
Et ₂ O	Diethylether
<i>et al.</i>	lat.: <i>et alii</i> , <i>et aliae</i> ; und andere
EtOAc	Essigsäureethylester
Fmoc	9-Flourenylmethoxycarbonyl
g	Gramm
gef.	gefunden
ges.	gesättigt
GS	Gramicidin S
h	Stunde
HATU	O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium-hexafluorphosphat
HBTU	2-(1-H-benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium-hexafluorphosphat
HCTU	O-(6-Chlorbenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i> (Heterokern-Mehrbindungs-Korrelations-Spektroskopie)
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
HOBt	1-Benzotriazol
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HRMS	<i>High Resolution Mass Spectroscopy</i> (Hochaufgelöste Massenspektrometrie)
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i> (Heterokern-Einquanten-Korrelations-Spektroskopie)
Hz	Hertz

Abkürzungen

<i>J</i>	skalare Kopplung
K	Kelvin
konz.	konzentriert
LCPA	<i>Long Chain Polyamine</i> (Langkettiges Polyamin)
LL	<i>low loading</i> (niedrige Beladung)
m	Multiplett
Me	Methyl
MeOH	Methanol
MHz	Megahertz
min	Minute
MRE	<i>Mean Residue Ellipticity</i> (Mittlere molare Elliptizität)
Ms	Methansulfonyl
NBS	<i>N</i> -Bromsuccinimid
NMO	<i>N</i> -Methylmorpholin- <i>N</i> -oxid
NMR	NMR <i>Nuclear Magnetic Resonance</i> (Kernspinresonanz)
NOE	<i>Nuclear Overhauser Effect</i> (Kern-Overhauser-Effekt)
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy</i> (Kern-Overhauser-Effekt verstärkende Spektroskopie)
Oxyrna	Hydroxyiminocyanessigsäureethylester
ppb	<i>part per billion</i> (Teile pro Milliarde)
ppm	<i>part per million</i> (Teile pro Million)
PrP	Prion-Protein
PTM	Posttranslationale Modifikation
PTSA	<i>para</i> -Toluolsulfonsäure
q	Quartett
R_f	Retentionsfaktor
ROE	<i>Rotating-frame nuclear Overhauser Effect</i> (im rotierenden Koordinatensystem auftretender Kern-Overhauser-Effekt)
ROESY	<i>Rotating-frame nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i> (Kern-Overhauser-Effekt verstärkende Spektroskopie im rotierenden Koordinatensystem)

Abkürzungen

RP	<i>Reversed Phase</i> (Umkehrphase)
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
S _{br}	breites Singulett
SEM	Sekundärelektronenmikroskopie
SPPS	<i>Solid Phase Peptide Synthesis</i> (Festphasenpeptidsynthese)
t	triplett
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -Butyl
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TIPS	Tri- <i>iso</i> -propylsilan
TMOS	Tetramethoxysilan/ Tetramethylorthosilicat
TOCSY	<i>Total Correlation Spectroscopy</i> (Totale Korrelations-Spektroskopie)
<i>t</i> _R	Retentionszeit
TSP	Natrium-(Trimethylsilyl)-propionat- <i>d</i> 4
UV	Ultraviolett
Vis	<i>visible</i> (sichtbar)
WATERGATE	<i>Water Suppression by Gradient Tailored Excitation</i>

Ein- und/oder Dreibuchstabencode der kanonischen sowie in dieser Arbeit relevanten Aminosäuren

Acp		4-Acetamidoprolin
Ahx		ε-Aminohexansäure
Ala	A	Alanin
Amp		4-Aminoprolin
Aop		4-Aminooxyprolin
Arg	R	Arginin

Abkürzungen

Asn	N	Asparagin
Azp		4-Azidoprolin
Cys	C	Cystein
Dab		1,4-Diaminobuttersäure
Dhp		3,4-Dehydroprolin
Dyp		(3 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-Dihydroxy-L-prolin
dyp		(3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)-Dihydroxy-L-prolin
Flp		4(<i>R</i>)-Fluorprolin
Fmp		4-Formamidoprolin
Gln	Q	Glutamin
Glu	E	Glutaminsäure
Gly	G	Glycin
His	H	Histidin
3-Hyp		3(<i>R</i>)-Hydroxyprolin
Hyp/4-Hyp	U	4(<i>R</i>)-Hydroxyprolin
Ile	I	Isoleucin
Leu	L	Leucin
Lys	K	Lysin
Met	M	Methionin
Orn		Ornithin
Oxp		4-Oxoacetamidoproline
Phe	D	Phenylalanin
Pro	P	Prolin
Pvp		4-Pivaloylamidoprolin
Ser	S	Serin
Thr	T	Threonin
Trp	W	Tryptophan
Tyr	Y	Tyrosin
Val	V	Valin

1. Einleitung

1.1. Kollagen

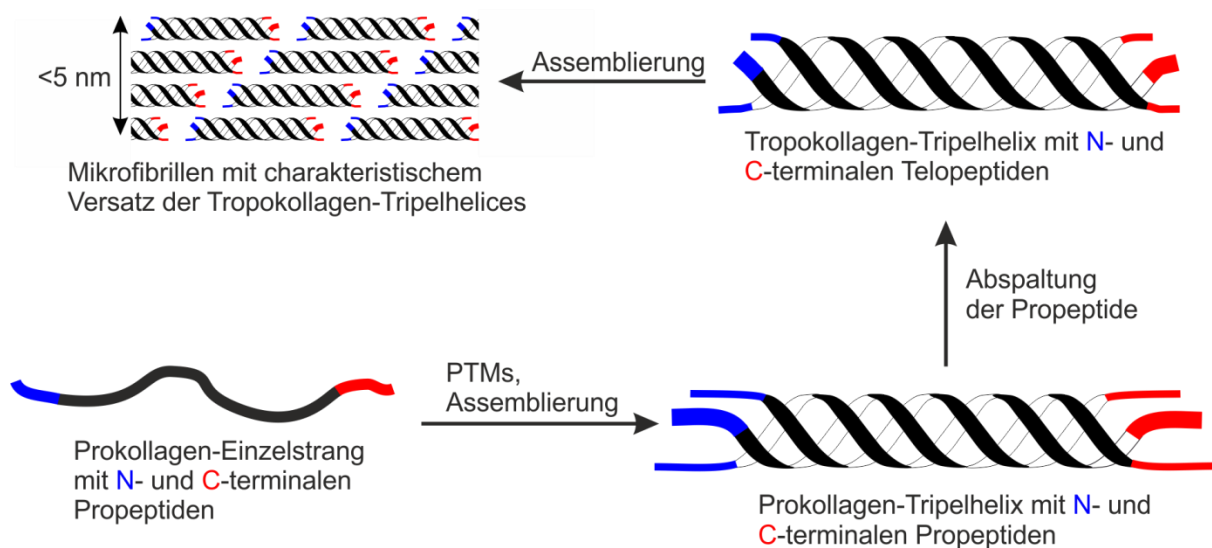
Kollagen ist das häufigste extrazelluläre Strukturprotein und macht dabei etwa 30% der Proteinmasse im Menschen aus.^[1–3] Die Primärsequenz dieser Proteinklasse lässt sich dabei auf $(\text{Xaa-Yaa-Gly})_n$ eingrenzen.^[4] Jede dritte Aminosäure ist Glycin, während in Xaa- und Yaa-Position eine große Variation von Aminosäuren gefunden werden kann. Neben Glycin (33%) weisen Prolin (13%), Alanin (11%) und Hydroxyprolin (10%) die größten Häufigkeiten in natürlichem Kollagen auf, wobei Hydroxyprolin ausschließlich in Yaa-Position zu finden ist. δ -Hydroxylysin (0,6%), Methionin (0,6%), Histidin (0,5%), Tyrosin (0,3%) und Cystein (0,1%) weisen hingegen die geringsten Häufigkeiten auf. Tryptophan kommt als einzige kanonische Aminosäure in natürlichem Kollagen nicht vor.^[3] Neben der starken Heterogenität der Aminosäuresequenz, weist natürliches Kollagen auch eine ganze Reihe von posttranslationalen Modifikationen auf. Die prominenteste ist dabei die durch die Prolyl-4-Hydroxylase katalysierte Hydroxylierung von Prolin zu Hydroxyprolin.^[5–7] Außerdem stellen Phosphorylierungen^[8–10] und Glykosylierungen^[11, 12] häufige Modifikationen von Kollagenen dar. Das Vorkommen von Kollagen in vielen verschiedenen Teilen des Körpers wie Haut, Sehnen, Knorpel, Knochen und Gefäßen liegt auch in dieser strukturellen Vielfalt begründet. Bis heute sind 28 (Typ I bis Typ XXVIII) verschiedenen Kollagentypen charakterisiert, von denen viele allerdings nur sehr spezifisch exprimiert werden und daher vergleichsweise kleine Häufigkeiten aufweisen.^[13, 14]

1.1.1. Struktur und Biosynthese

Kollagene werden als Einzelstrang an den membrangebundenen Ribosomen des endoplasmatischen Retikulums synthetisiert.^[14] Dabei sind die Einzelstränge C- und N-Terminal um Propeptide verlängert. Die posttranslationalen Modifikationen finden intrazellulär im Lumen statt. Zu diesen Modifikationen zählen vor allem Hydroxylierungen von Prolinen in 3- und 4-Position oder Lysinen, sowie Glykosylierungen.^[15] Die Bildung von Disulfiden zwischen den C-terminalen

Einleitung

Propeptiden ist Ausgangspunkt einer tripelhelikalen Assemblierung zum Prokollagen.^[16] Extrazellulär erfolgt nun die Abspaltung der Propeptide vom tripelhelikalen Prokollagen und es bildet sich Tropokollagen, an dessen N- und C-Terminus noch Telopeptide gebunden sind.^[2] Pro- bzw. Tropokollagen haben eine Länge von etwa 300 nm und einen Durchmesser von 1-2 nm. Erst jetzt erfolgt eine Assemblierung zu Mikrofibrillen mit einem Durchmesser von etwa 5 nm. Diese erfolgt allerdings mit einem leichten Versatz zwischen den verschiedenen Tripelhelices was Ursache für das charakteristische Bandenmuster in TEM- oder SEM-Aufnahmen ist.^[17] Im abschließenden Schritt erfolgt eine kovalente Verknüpfung der Mikrofibrillen zu Kollagenfasern mit einer Länge von bis zu 1 cm und einem Durchmesser von bis zu 500 nm.^[2] Die Biosynthese ist in Schema 1 dargestellt.



Schema 1: Biosynthese von Kollagen. Erst erfolgt eine ribosomale Synthese des Prokollageneinzelstrangs mit N- und C-terminalen Propeptiden, welcher sich nach posttranslationalen Modifikationen zur Tripelhelix assembliert. Nach extrazellulärer Abspaltung der Propeptide bildet sich das Tropokollagen, welches zu Mikrofibrillen mit charakteristischem Versatz der Tripelhelices assembliert. Ein kovalentes Verknüpfen der Mikrofibrillen führt zur Kollagenfaser (hier nicht dargestellt).^[2]

Kollagene bilden eine rechtsgängige Tripelhelix bestehend aus drei linksgängigen Polyprolin-II Helices (PPII), der α -Stränge. Die Aminosäure Glycin in jeder dritten Position ist dabei von enormer Bedeutung, da durch das Fehlen einer Seitenkette eine Anordnung im inneren der Tripelhelix möglich ist. Dabei ist auch die Art der tripelhelikalen Struktur in natürlichem Kollagen stark von der Sequenz abhängig. So

Einleitung

liegen Prolin-arme Regionen als 2/7-Helix und Prolin-reiche Regionen als 3/10-Helix vor, wobei dieser Unterschied auch eine Rolle in der molekularen Erkennung spielt.^[18–21] Die Einzelstränge (α -Stränge) innerhalb dieser tripelhelikalen Struktur können noch einmal eingeteilt werden. Bei natürlichem Kollagen geschieht diese Einteilung durch die Mikroheterogenität phänomenologisch. Die Einzelstrangzusammensetzung der Tripelhelix von Typ I bis Typ VIII Kollagen ist dabei in Tabelle 1 dargestellt.^[1, 2, 22]

Tabelle 1: Zusammensetzung der Tripelhelix verschiedener Kollagentypen anhand der Einzelstränge. Der Einzelstrang wird mit α bezeichnet und entsprechend nummeriert. Der Kollagentyp wird in eckigen Klammern notiert und der Index beschreibt die Anzahl der Einzelstränge dieses Typs innerhalb einer Tripelhelix.^[2]

Kollagentyp	Homotrimer	Heterotrimer
I		$\alpha 1[I]_2 \alpha 2[I]$
II	$\alpha 1[II]_3$	
III	$\alpha 1[III]_3$	
IV		$\alpha 1[IV]_2 \alpha 2[IV]$ $\alpha 3[IV] \alpha 4[IV] \alpha 5[IV]$ $\alpha 5[IV]_2 \alpha 6[IV]$
V	$\alpha 1[V]_3$	$\alpha 1[V]_2 \alpha 2[V]$ $\alpha 1[V] \alpha 2[V] \alpha 3[V]$
VI		$\alpha 1[VI] \alpha 2[VI] \alpha 3[VI]$ $\alpha 1[VI] \alpha 2[VI] \alpha 4[VI]$
VII		$\alpha 1[VII]_2 \alpha 2[VII]$
VIII	$\alpha 1[VIII]_3$ $\alpha 2[VIII]_3$	$\alpha 1[VIII]_2 \alpha 2[VIII]$

Aufgrund dieser Mikroheterogenität und der verschiedenen Strukturtypen von natürlichem Kollagen, finden eine Untersuchung verschiedener Modifikationen und ihr Einfluss auf die Struktur an Kollagen-Modellpeptiden statt. Diese sind aus eine definierten Anzahl (5 bis 10) von Xaa-Yaa-Gly-Triplets aufgebaut.^[23–25] Das Pro-Hyp-Gly-Triplet ist dabei die dominante Repetiereinheit, da diese auch mit 10% die häufigste Struktureinheit in natürlichem Kollagen ist.^[26]

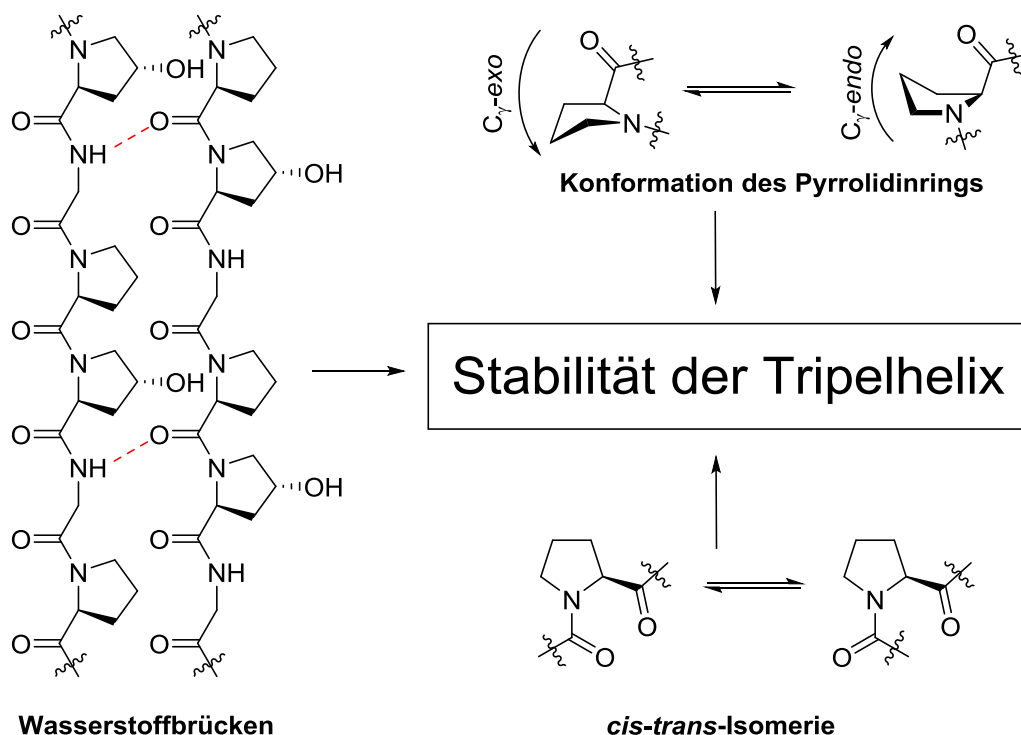
1.1.2. Stabilität der Tripelhelix

Die Stabilität der tripelhelikalen Struktur von Kollagenen wird durch ihren Schmelzpunkt charakterisiert. Dieser ist als Punkt, an dem 50% der tripelhelikalen Struktur entfaltet ist, bzw. als Wendepunkt der sigmoidalen Schmelzkurve definiert.^[23, 27–34] Diese Art der Charakterisierung wird allerdings nur bei Modellsequenzen verwendet, da diese zum einen löslich und zum anderen eine Schmelztemperatur, welche mit der Anzahl der Repetiereinheiten skaliert, unterhalb von 100 °C aufweisen.^[35, 36] Es fällt auf, dass Prolin und Prolin-Derivate nicht nur eine große Häufigkeit in Xaa- und Yaa-Positionen haben, sondern auch zu einer großen Stabilisierung der Tripelhelix führen.^[37, 38] Die Stabilität der Struktur lässt sich allerdings nicht auf einzelne Parameter beschränken, sondern muss als Kombination dieser aufgefasst werden. So ist beispielsweise der Beitrag einer Wasserstoffbrücke zwischen dem Glycin-NH und dem Carbonyl der Aminosäure in Xaa-Position auf etwa -2 kcal/mol bestimmt worden, wobei der Wert in natürlichem Kollagen mit -1,4 kcal/mol etwas geringer ist.^[39, 40] Durch zusätzliche Wasserstoffbrückenbindungen kann eine Stabilisierung der tripelhelikalen Struktur erreicht werden.^[41, 42]

Als einzige proteinogene Aminosäure bilden Prolin und Prolin-Derivate in signifikanten Anteil *cis*-konfigurierter Amidbindungen.^[43–45] Innerhalb der Tripelhelix weisen die Amidbindungen hingegen eine *all-trans*-Konfiguration auf. Zur Bildung der Tripelhelix müssen also alle *cis*-Aminbindungen in die *trans*-Konfiguration isomerisiert werden. In natürlichem Kollagen wird dies durch Peptidyl-Prolyl-*cis-trans*-Isomerasen ermöglicht.^[46, 47] Außerdem wird angenommen, dass eine Präorganisation zur PPII-Helix eine Assemblierung zur Tripelhelix beschleunigt, da diese dann entropisch begünstigt sein sollte.^[48] Eine Stabilisierung der *trans*-konfiguration führt hingegen zu einer Destabilisierung der Struktur.^[49]

Im Fokus der Forschung der letzten Jahrzehnte stand allerdings der stabilisierende Effekt der Aminosäure in Yaa-Position. Eine Hydroxylierung des Prolins in dieser Position führt zu einer drastischen Zunahme des Schmelzpunktes der Tripelhelix.^[50, 51] Dass dieser stabilisierende Effekt auf Wasserstoffbrückenbindungen der Hydroxyfunktion zurückzuführen ist, wurde zunächst angenommen, konnte aber später widerlegt werden.^[52, 53] Deutlich größer ist der Einfluss der Konfiguration des Pyrrolidinrings auf die Stabilität der tripelhelikalen Struktur. Dabei wird vor allem

zwischen C_{γ} -*exo*- und C_{γ} -*endo*-Konfiguration unterschieden.^[54–57] Zusammen mit der Neigung zur Ausbildung einer *trans*-Amidbindung konnte daraus ein Erklärungsmodell für den stabilisierenden Effekt von Prolin-Derivaten mit Substituenten in γ -Position abgeleitet werden.^[27, 53, 55, 58–60] Eine Übersicht über die hier beschriebenen Stabilisierungsmechanismen ist in Schema 2 gezeigt.



Schema 2: Stabilisierungsmechanismen innerhalb der Tripelhelix. Wasserstoffbrücken (in rot angedeutet) zwischen dem Gly-NH und dem Carbonyl der Aminosäure in Xaa-Position stabilisieren die Tripelhelix. Ebenso hat die Konformation des Pyrrolidinrings sowie die Tendenz zur Bildung von *cis*- bzw. *trans*-Amidbindung starken Einfluss auf die Stabilität der Tripelhelix.

Hieran wird deutlich, dass immer nur ein Aspekt der Stabilisierung variiert werden sollte, was allerdings in vielen Fällen schwierig zu realisieren ist, da beispielsweise eine Modifikation zu Änderung der Konformation des Pyrrolidinrings oftmals auch mit einer Änderung der Tendenz zur Ausbildung von *cis*- oder *trans*-Amidbindung einhergeht.^[61]

1.1.3. NMR-Spektroskopie mit Kollagenen

Im Vergleich zu Methoden wie der CD-Spektroskopie, kommt die NMR-Spektroskopie zur Charakterisierung von Kollagen-Modellpeptiden nur selten zum

Einsatz. Das liegt vor allem an der Tatsache, dass sich die Charakterisierung in den meisten Fällen auf dem Schmelzpunkt, als Maß für die Stabilität der Tripelhelix, beschränkt.^[25, 39, 60, 62, 63] Mittels NMR-Spektroskopie lässt sich eine deutlich detailliertere Untersuchung von Kollagen-Modellpeptiden durchführen. Jedoch ist dies auch mit einer Reihe von Problemen verbunden. Die limitierte Anzahl verschiedener Aminosäure und die Kollagen Sequenz aus Repetiereinheiten, zusammen mit einer symmetrischen tripelhelikalen Assemblierung führt zu einer starken Überlappung der einzelnen Signale, was eine Interpretation der Spektren deutlich erschwert.^[64] Eine genaue Zuordnung aller Signale ist also kaum möglich, sodass die Zuordnung in der Regel nach Signalgruppen erfolgt.^[65] Aus diesem Grund wird die NMR-Spektroskopie hauptsächlich bei Kollagensequenzen eingesetzt, welche sich in einzelnen Aminosäuren von einer (Pro-Hyp-Gly)_n-Sequenz unterscheiden oder Ausschnitte aus natürlichem Kollagen darstellen.^[23, 54, 65–69] Auch für die Untersuchung von Tripelhelices, welche aus verschiedenen Einzelsträngen bestehen, den Heterotrimeren, bietet sich die NMR-Spektroskopie an.^[69] Eine grundlegende strukturelle Untersuchung einer (Pro-Hyp-Gly)₁₀-Sequenz konnte allerdings erst durch eine systematische ¹⁵N-Gly-Markierung erreicht werden.^[64] Damit war es möglich, gezielt einen ¹⁵N-markierten Teil, wie C- oder N-Terminus, zu untersuchen. Dabei konnte nicht nur zwischen den drei Einzelstränge NMR-spektroskopisch differenziert werden, sondern es war auch möglich das Entfalten der Tripelhelix mit zehn Repetiereinheiten vom C- bzw. N-Terminus her zu beobachten, was ein zwei-Zustandsmodell für Kollagen-Modellpeptide dieser Länge in Frage stellt.^[64]

1.1.4. Modifikationen des Einzelstrangs

Die Modifikation eines Einzelstrangs mit 7 oder 10 Repetiereinheiten ist die dominierende Methode zur Untersuchung des Einflusses einer speziellen Modifikation auf die tripelhelikale Struktur. Dabei kann zwischen zwei verschiedenen Methoden unterschieden werden: Zum einem der globalen Modifikation des Kollagen-Einzelstrangs, bei dem jedes Triplet der Sequenz entsprechend modifiziert wird. Zum anderen die Modifikation an einem definierten Triplet der Sequenz, was zu so genannten *host-guest*-Peptiden führt.^[2] Die globale oder punktuelle Modifikation kann dabei sogar entgegengesetzte Auswirkungen auf Stabilität der Tripelhelix haben. Das Einführen von 4(*R*)-Fluorprolin (Flp) in Yaa-Position hat in einem *host*-

Einleitung

guest-Peptid einen destabilisierenden Effekt, während die globale Modifikation mit einem Flp in dieser Position zu einer deutlichen Stabilisierung der Tripelhelix führt (Tabelle 2).^[70–73]

Tabelle 2: Schmelztemperatur von Flp-modifizierten Kollagen-Modellpeptiden^[70–73]

Sequenz	Schmelztemperatur
H-(Pro-Hyp-Gly) ₁₀ -OH	47,3 °C
H-(Pro-Hyp-Gly) ₄ -(Pro-Flp-Gly)-(Pro-Hyp-Gly) ₅ -OH	43,7 °C
H-(Pro-Flp-Gly) ₁₀ -OH	87,0 °C

Die Synthese von Kollagen-Modelpeptiden mit der Modifikation jedes Triplets hat also nur eine begrenzte Aussagekraft für den Einfluss dieser Modifikation. Außerdem wird diese Art der Modifikation aufgrund des erhöhten synthetischen Aufwands lediglich mit leicht zugänglichen Aminosäuren wie Prolin, Hydroxyprolin, 4-Fluorprolin, 4-Methylprolin oder 4-Chlorprolin. Die so erhaltenen Kollagen-Modellpeptide unterscheiden sich dabei lediglich in der absoluten Konfiguration des Substituenten in 4-Position der verschiedenen Aminosäuren, sowie ihren Einbau in Xaa- oder Yaa-Position, was zu einer großen Anzahl verschiedener Modellpeptide führt.^[53, 55, 70, 72, 74–79]

Die Synthese von *host-guest* Kollagen-Modellpeptiden hat sich als eine deutlich bessere Methode herausgestellt, um die Auswirkungen punktueller Modifikationen auf die Tripelhelix zu untersuchen. Dabei ist vor allem eine strukturelle Nähe zu natürlichem Kollagen entscheidend, da eine kurze *host-guest*-Sequenz, wie (Pro-Hyp-Gly)₃-Xaa-Yaa-Gly-(Pro-Hyp-Gly)₃ aus ein Ausschnitte daraus angesehen werden kann.^[37, 68] Dies lässt deutlich detailliertere Studien über die stabilisierende bzw. destabilisierende Wirkung verschiedener Aminosäuren in Xaa- bzw. Yaa-Position zu. Für die proteinogenen Aminosäuren gibt es 400 verschiedene Möglichkeiten eines solchen Xaa-Yaa-Gly-Triplett.^[37, 38] Trotz dieser Vielzahl an möglichen Kombinationen, sind bereits 82, bzw. etwa 20%, der möglichen Verbindungen synthetisiert worden und in Tabelle 3 zusammen mit der Häufigkeit des Vorkommens in Kollagen Typ I, II, III, V und XI dargestellt.^[80]

Tabelle 3: Aminosäuren in Xaa und Yaa-Position innerhalb der Sequenz Ac-(PUG)₃-Xaa-Yaa-G-(PUG)₄-G-G-NH₂. Die grünen Felder symbolisieren die Kombinationen, welche bisher aus den 400 verschiedenen möglichen Verbindungen synthetisiert wurden. Für die Kombinationen welche rot markiert sind, existieren lediglich

Einleitung

Berechnungen.^[80] Als Zahlenwerte (in %) sind die jeweiligen statistischen Häufigkeiten der Aminosäuren in diesen Positionen, basierend auf Kollagen Typ I, II, III, V und XI, angegeben.

Y \ X	U	P	E	A	K	R	Q	D	L	V	M	I	N	S	H	T	C	Y	F	G	W
X	34,0	0,0	2,0	10,6	9,0	11,4	6,9	4,8	1,7	4,3	9,0	2,1	4,8	4,0	0,5	4,2	0,0	0,0	0,2	0,7	0,0
P 32,9																					
E 13,0																					
A 11,1																					
K 3,6																					
R 2,8																					
Q 2,9																					
D 4,9																					
L 7,8																					
V 2,6																					
M 0,9																					
I 2,0																					
N 2,1																					
S 4,9																					
H 1,6																					
T 1,8																					
C 0,0																					
Y 0,5																					
F 3,0																					
G 1,6																					
W 0,0																					

Deutlich zu erkennen ist, dass hauptsächlich Kollagen-Modellpeptide mit natürlichen Aminosäuren synthetisiert wurden, deren Aminosäuresequenz auch in natürlichem Kollagen eine überdurchschnittliche Häufigkeit aufweist. Eine zusätzliche Erweiterung dieser Tabelle um die jeweiligen D-Aminosäuren liefert 1600 verschiedenen Möglichkeiten. Allerdings führen D-Aminosäuren in der Kollagensequenz nicht zur Bildung einer Tripelhelix, sondern zu *random-coil* Strukturen, weshalb Studien zu Kollagen-Modellpeptiden nahezu ausnahmslos mit L-konfigurierten Aminosäuren durchgeführt werden.^[81, 82]

Im Gegensatz zu natürlichen Aminosäuren, lässt der Einbau von unnatürlichen Aminosäuren eine deutlich breitere Variation der Struktur zu. Dabei sind vor allem in 3- oder 4-Position modifizierte Prolin-Derivate, sowie von Aminosäuren abgeleitete Struktur motive, in Yaa-Position Gegenstand von Studien. Eine Übersicht verschiedener Modifikationen in Xaa- und Yaa-Position ist dabei in Tabelle 4 dargestellt.

Einleitung

Tabelle 4: Übersicht über verschiedene Modifikationen in Xaa- oder Yaa-Position für Kollagen-Modellpeptide der allgemeinen Sequenz (Pro-Hyp-Gly)_n-Xaa-Yaa-Gly-(Pro-Hyp-Gly)_m.

	Proline mit Modifikation in 3-Position	Proline mit Modifikation in 4-Position	Andere Aminosäuren
Xaa-Position	3(<i>R</i>)-Hyp ^[83]	4(<i>S</i>)-Acp ^[56] , 4(<i>S</i>)-Fmp ^[56] 4(<i>S</i>)-Amp ^[58] , 4(<i>S</i>)-Pvp und 4(<i>R</i>)-Pvp ^[28] 4(<i>S</i>)-Aop und 4(<i>R</i>)-Aop ^[84] 4(<i>S</i>)-Oxp und 4(<i>R</i>)-Oxp ^[84] 4(<i>S</i>)-Azp und 4(<i>R</i>)-Azp mit anschließender <i>click</i> -Chemie ^[85]	azaProlin ^[82] <i>N</i> -Methyl-Alanin ^[33] Gly-Pro-Isoster ^[49]
Yaa-Position	3(<i>R</i>)-Hyp ^[83]	4(<i>S</i>)-Acp ^[56] , 4(<i>S</i>)-Fmp ^[56] 4(<i>S</i>)-Amp ^[58] , 4(<i>S</i>)-Mep ^[58] 4(<i>R</i>)-Hyp ^[28] , 4(<i>S</i>)-Flp ^[71] 4(<i>S</i>)-Pvp und 4(<i>R</i>)-Pvp ^[28] 4(<i>S</i>)-Aop und 4(<i>R</i>)-Aop ^[84] 4(<i>S</i>)-Oxp und 4(<i>R</i>)-Oxp ^[84] 4(<i>S</i>)-Azp und 4(<i>R</i>)-Azp mit anschließender <i>click</i> -Chemie ^[85]	<i>N</i> -Methyl-Alanin ^[33]

Es fällt auf, dass Prolin-Modifikationen, aufgrund struktureller Ähnlichkeiten mit Hydroxyprolin, in den meisten Fällen in 4-Position untersucht werden und Modifikationen in 3-Position oder gar der Einbau von Isosteren im Vergleich dazu eher selten beschrieben ist.

1.1.5. Verknüpfung von Einzelsträngen

Neben der Modifikation der Kollagen-Einzelstränge, stellt die Verknüpfung von Einzelsträngen eine weitere Methode zur Stabilisierung der tripelhelikalen Struktur dar. Dabei kann zwischen zwei verschiedenen Verknüpfungsmodi unterschieden werden. Zum einen einer Verknüpfung der Einzelstränge am Terminus der Tripelhelix^[23, 65, 86–89], zum anderen einer Verknüpfung innerhalb der Helix^[84, 90], sogenannten *cross-links*, welche in natürlichem Kollagen aufgrund der Länge der Aminosäuresequenz häufig auftreten (Abbildung 1).^[2, 91]

Einleitung



Abbildung 1: Verschiedene Verknüpfungsmodi der Kollagen-Einzelstränge. **Links:** Terminale Verknüpfung. **Rechts:** Verknüpfung der Einzelstränge (schwarz) durch *cross-links* (rot).

Für das Verknüpfen der Einzelstränge am N-^[23, 65, 86, 88, 92] bzw. C-Terminus^[87–89, 93] werden in der Literatur verschiedene Begriffe verwendet. Neben *linker*^[4], *scaffold*^[86] und *template*^[92] wird auch der Begriff *cap*^[87] verwendet. Die Verwendung der Begriffe *scaffold* oder *template* ist allerdings oftmals problematisch, da prinzipiell auch die Tripelhelix als *template* oder *scaffold* für die Verknüpfungseinheit sein kann und die Begriffe eher aus einer makroskopischen Betrachtungsweise von Überstrukturen stammen^[94–96]. Ein rein phänomenologischer Begriff wie *linker* oder *cap* bietet sich hier eher an. Daher wird im Folgenden der Begriff des *caps* bzw. des *cappings* für das terminale Abschließen der Kollagen-Tripelhelix durch Verknüpfung der Einzelstränge verwendet. Einige Beispiele für *cap*-Strukturen sind in Abbildung 2 aufgeführt.

Einleitung

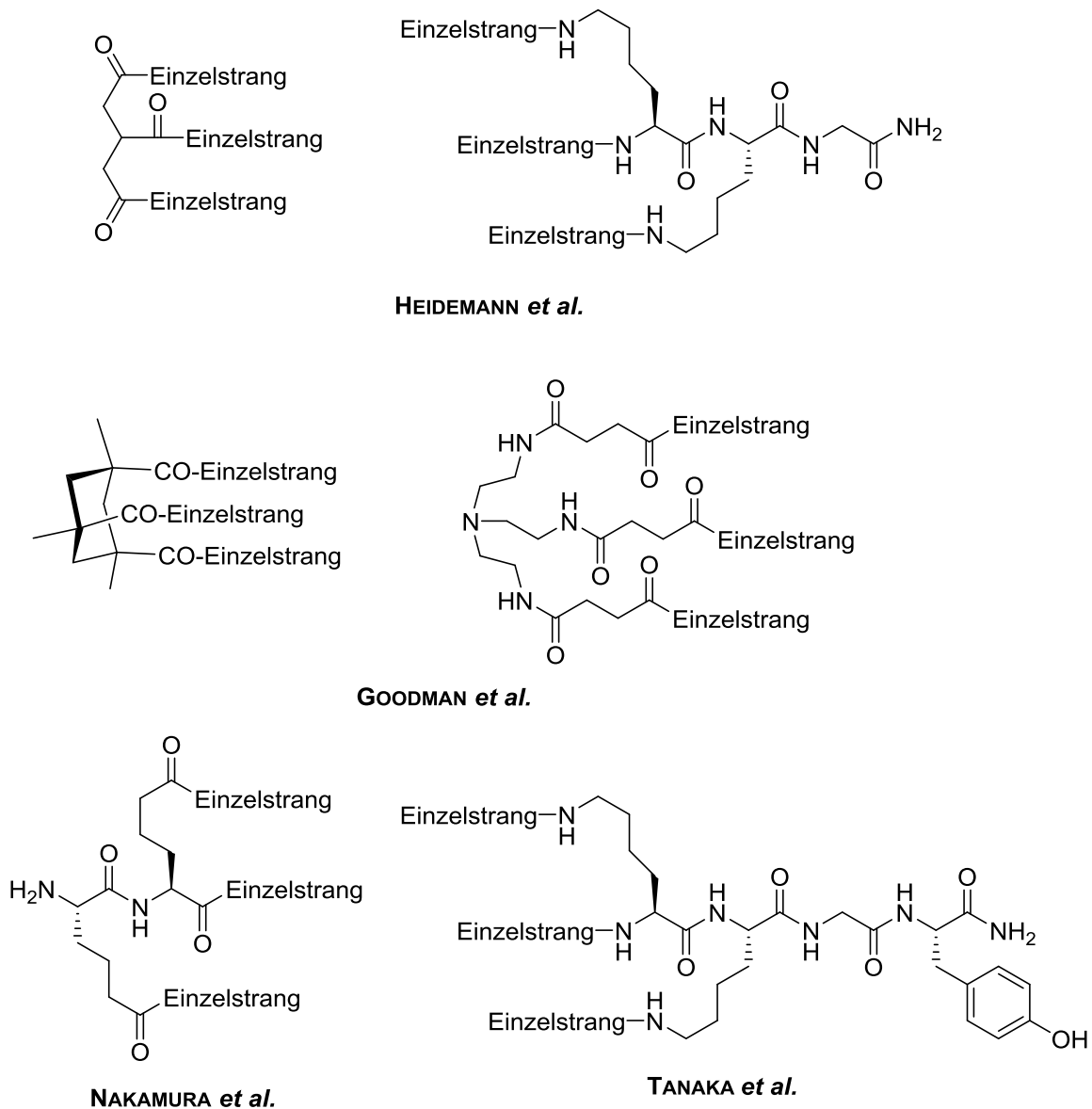


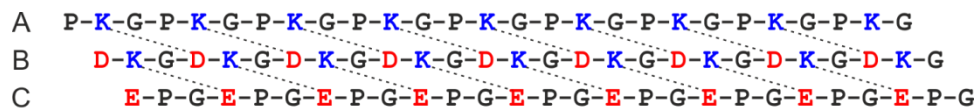
Abbildung 2: Verschiedene N- und C-terminale caps. Eine C-terminale Verknüpfung mittels eines Lysin-Lysin-Strukturmotivs wurde dabei bereits von HEIDEMANN realisiert und von TANAKA weiterentwickelt.^[88, 97] Eine N-terminale Verknüpfung mit C₂- bzw. C₃-symmetrischen caps wurde von HEIDEMANN und GOODMAN beschrieben, während eine Verknüpfung mittels Glutaminsäure-Glutaminsäure-Strukturmotiv von NAKAMURA durchgeführt wurde.^[23, 86, 89]

Im Vergleich zum *capping* der tripelhelikalen Struktur sind *cross-links* in Kollagen-Modellpeptiden deutlich seltener beschrieben, was vor allem auf den deutlich erhöhten synthetischen Aufwand zurückzuführen ist. Während die ersten *cross-links* mittels Disulfidbrücken durch ENGEL *et al.* noch unselektiv aufgebaut wurden, gelang es RAINES und KOTCH durch großen synthetischen Aufwand der selektive Aufbau eines Heterotrimer.^[90, 98] Die Bildung von Heterotrimeren mit anschließender Verknüpfung der Einzelstränge einer Einzigen von vielen möglichen Heterotrimeren

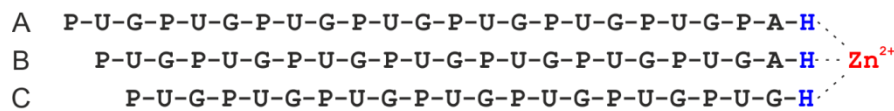
Einleitung

Strukturen stellen hierbei den aktuellen Forschungsstand dar. Dies erfolgte entweder mittels Oxim-Ligation oder durch die Verknüpfung mittels Amidin.^[84, 99]

Neben dem kovalenten Verknüpfen von Einzelsträngen sind nicht-kovalente Verknüpfungen von Kollagen-Einzelsträngen Literaturbekannt. Hier kann grundsätzlich zwischen zwei verschiedenen Konzepten unterschieden werden. Zum einen die Stabilisierung der Tripelhelix durch Wechselwirkung zwischen positiven und negativen Permanentladungen von Lysin- und Asparagin- bzw. Glutaminsäure-Seitenketten.^[29, 100, 101] Zum anderen durch die koordinative Bindung von Metallionen durch Histidin-Seitenketten oder Bipyridin-modifizierte Kollagen-Modellpeptide.^[102, 103] Der schematische Aufbau solcher Heterotrimere ist in Abbildung 3 gezeigt.



HARTGERINK *et al.*



NANDA *et al.*

Abbildung 3: Verschiedene Heterotrimere (Einzelstränge A, B und C). **Oben:** Stabilisierung durch Ladungswechselwirkung von Lysin- mit Asparagin- und Glutaminsäure-Seitenketten.^[29] **Unten:** Stabilisierung durch Koordination eines Zinkions durch Histidin-Seitenketten.^[102] Koordination und ionische Wechselwirkungen sind durch gestrichelte Linien angedeutet.

Hierbei muss allerdings erwähnt werden, dass gerade bei Kollagen-Modellpeptiden mit vielen Permanentladungen, selektiv ein Heterotrimer gebildet wird, die verschiedenen Einzelstränge jedoch nicht in der Lage sind Homotrimere zu bilden. Eine Metallkoordination führt hingegen zu einer Stabilisierung der tripelhelikalen Struktur, welche allerdings deutlich geringer ausfällt als bei kovalent verknüpften Einzelsträngen.^[100–103]

1.2. Boronsäuren

Boronsäuren finden in der organischen Chemie eine breite Anwendung. Das prominenteste Beispiel für eine solche Reaktion stellt die *Suzuki-Miyaura*-Kreuzkupplung zwischen einem Arylhalogenid und einer Boronsäure dar.^[104, 105] Es sind aber auch weitere Kreuzkupplungen, sowie asymmetrische 1,4-Additionen oder Reduktionen mit Organoboronsäuren beschrieben.^[106–109]

In der medizinischen Chemie sind weiterhin eine Reihe von Enzyminhibitoren beschrieben, welche eine Boronsäure als funktionelle Gruppe aufweisen. Auffällig ist hierbei, dass es sich um Boronsäureanaloge von Aminosäuren handelt (Abbildung 4).

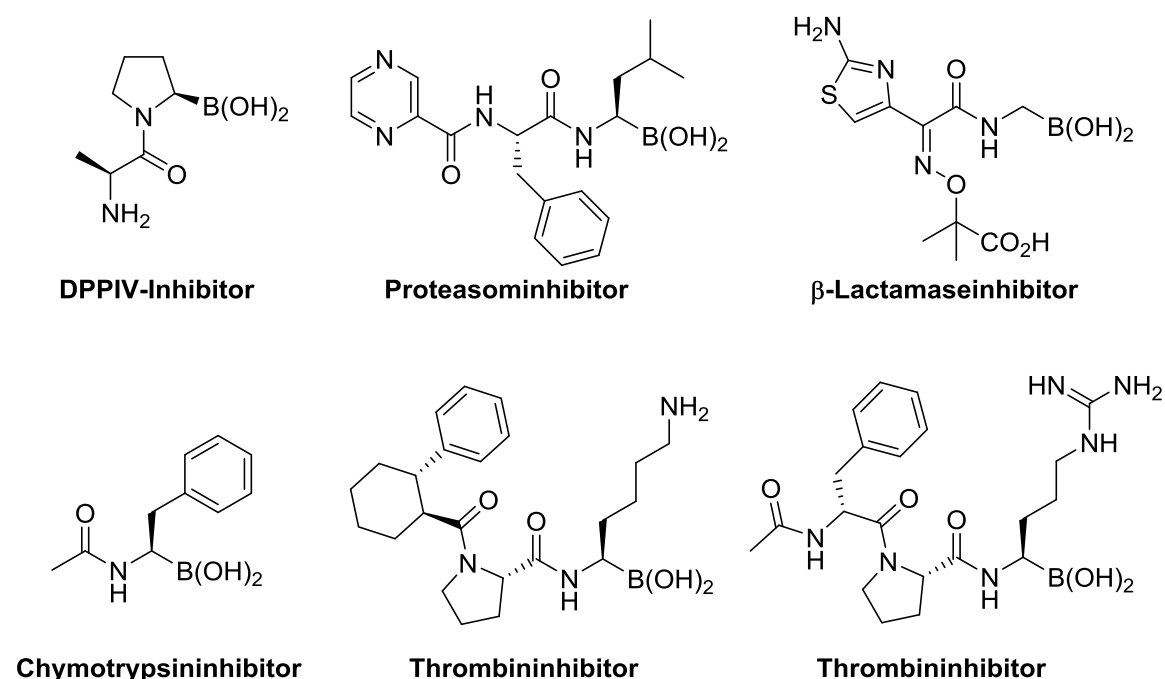


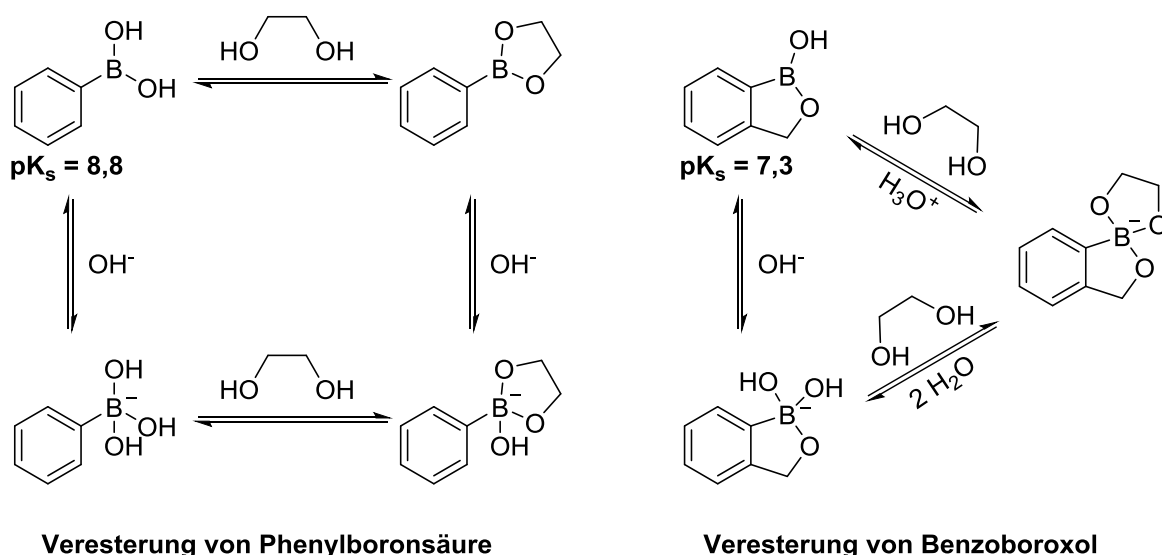
Abbildung 4: DPP-IV-Inhibitor^[110], Proteasominhibitor^[111], β -Lactamaseinhibitor^[112], Chymotrypsininhibitor^[113] und die Thrombininhibitoren^[114, 115] sind von Aminosäuren abgeleitete Boronsäuren.

Eine weitere wichtige Eigenschaft von Boronsäuren ist die reversible Bindung von Diolen.^[116–118] Diese Eigenschaft hat in den letzten Jahrzehnten vor allem in der Zuckersensorik an Bedeutung gewonnen.^[119–121]

1.2.1. Benzoboroxol als Diolbinder

Neben Boronsäuren ist Benzoboroxol, welches 1957 erstmals beschrieben wurde, in den vergangenen Jahren vermehrt Gegenstand von Studien geworden.^[122–124]

Benzoboroxol ist ein Oxaborolring, also ein zyklischer Boronsäuremonoester, mit anniliertem Phenylring. Benzoboroxol hat mit 7,3 einen geringeren pK_s -Wert als Phenylboronsäure mit 8,8.^[125, 126] Der niedrigere pK_s -Wert lässt sich mit einer schlechteren Orbital-Wechselwirkung zwischen Bor- und Sauerstoffatom durch die erhöhte Rigidität des Oxaborolrings, was zu einem erhöhtem Elektronendefizit und damit zu einer erhöhten Acidität führt.^[124, 127] Eine Veresterung von Phenylboronsäure und Benzoboroxol in wässriger Lösung ist in Schema 3 dargestellt.



Schema 3: Veresterung von verschiedenen Boronsäure-Derivaten in wässriger Lösung. **Links:** Veresterung von Phenylboronsäure. Die Reaktion mit dem Diol erfolgt, je nach pH-Wert der Lösung, mit Phenylboronsäure oder seiner Boronatform. Es besteht ebenfalls ein Gleichgewicht zwischen dem Boronsäureester und dem entsprechenden Boronat. **Rechts:** Veresterung von Benzoboroxol. Die Veresterung findet auch hier, abhängig vom pH-Wert, ausgehend vom Benzoboroxol oder seiner Boronatform statt. Das Reaktionsprodukt ist allerdings in beiden Fällen das gezeigte Boronat.

Benzoboroxol ist darüber hinaus ein potenter Binder von Diolen in wässriger Umgebung und physiologischem pH. Trotzdem ist die Affinität zu einem Diol stark pH-abhängig. Außerdem lässt sich sagen, dass je näher pK_s -Werte von Benzoboroxol und Diol beieinander liegen, desto weiter liegt das Gleichgewicht auf Seite des Esters.^[128] Wie auch Boronsäuren finden Benzoboroxol und Benzoboroxol-

Einleitung

modifizierte Peptidstrukturen Anwendung in der Zuckersensorik.^[129–133] Auch zum Wirkstofftransport mittels molekularer Erkennung konnten Benzoboroxol-haltige Verbindungen erfolgreich eingesetzt werden.^[134–137] Benzoboroxol-Derivate können auch direkt als Wirkstoff eingesetzt werden. So konnte bereits eine Wirkung von Benzoboroxol-Derivaten gegen Tuberkulose beobachtet werden.^[138] Die bekannteste Verbindung stellt Tavaborol dar, welche als Antimykotikum in den USA zugelassen ist.^[139] Einige Wirkstoffe sind in Abbildung 5 dargestellt.

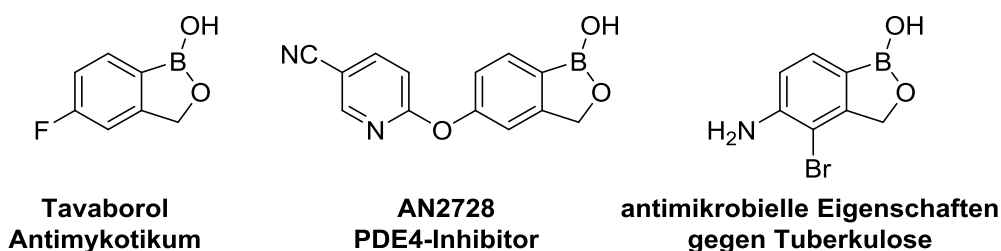


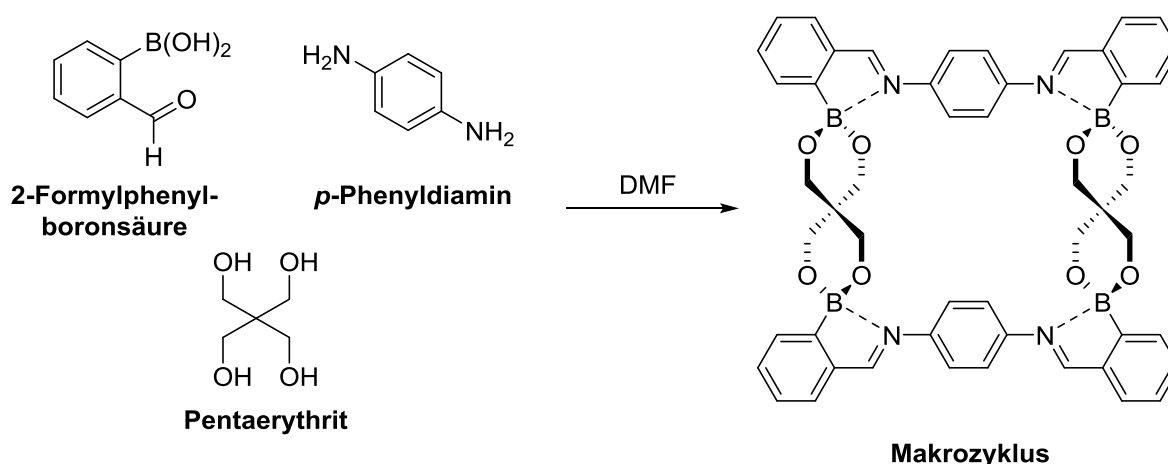
Abbildung 5: Verschiedene Benzoboroxol-Derivate mit biologischer Wirkung. Tavaborol ist in den USA als Antimykotikum zugelassen.^[139] AN2728 zeigt eine Inhibierung von PDE4 und verschiedene Aminoboroxole zeigten eine antimikrobielle Wirkung gegen Tuberkulose-Bakterien.^[137, 138, 140]

Ein relativ neues Forschungsgebiet stellt die Bildung von Polymeren mithilfe von Benzoboroxolen. Mittels Elektrosponnen eines Ethylen-Vinylalkohol-Copolymers als Polymer mit vielen Hydroxyfunktionen und eines Benzoboroxol-haltigen Copolymers gelang es Nanofasern herzustellen.^[141] Zudem konnte aus einem Benzoboroxol-haltigen Copolymer und einem Zucker-modifiziertem Copolymer ein biokompatibles Hydrogel dargestellt werden.^[142–144]

Die diolbindenden Eigenschaften von Benzoboroxolen konnte außerdem in der Affinitätschromatographie eingesetzt werden. Benzoboroxol-modifizierte Säulenmaterialien waren in der Lage *cis*-Diol-haltige Biomoleküle, wie Glykoproteine, mittels Affinitätschromatographie zu reinigen.^[145, 146]

1.2.2. Selbstassemblierung mit Boronsäuren

Da die Bildung der Boronsäureester reversibel verläuft, bietet sich Boronsäuren und Diole für die Aufbau selbstassemblierender Strukturen an. Im Jahr 2008 wurde erstmals eine drei-Komponentenreaktion zwischen 2-Formylphenylboronsäure, einem Diamin und einem Polyol für den Aufbau von Makrozyklen beschrieben (Schema 4).^[147]

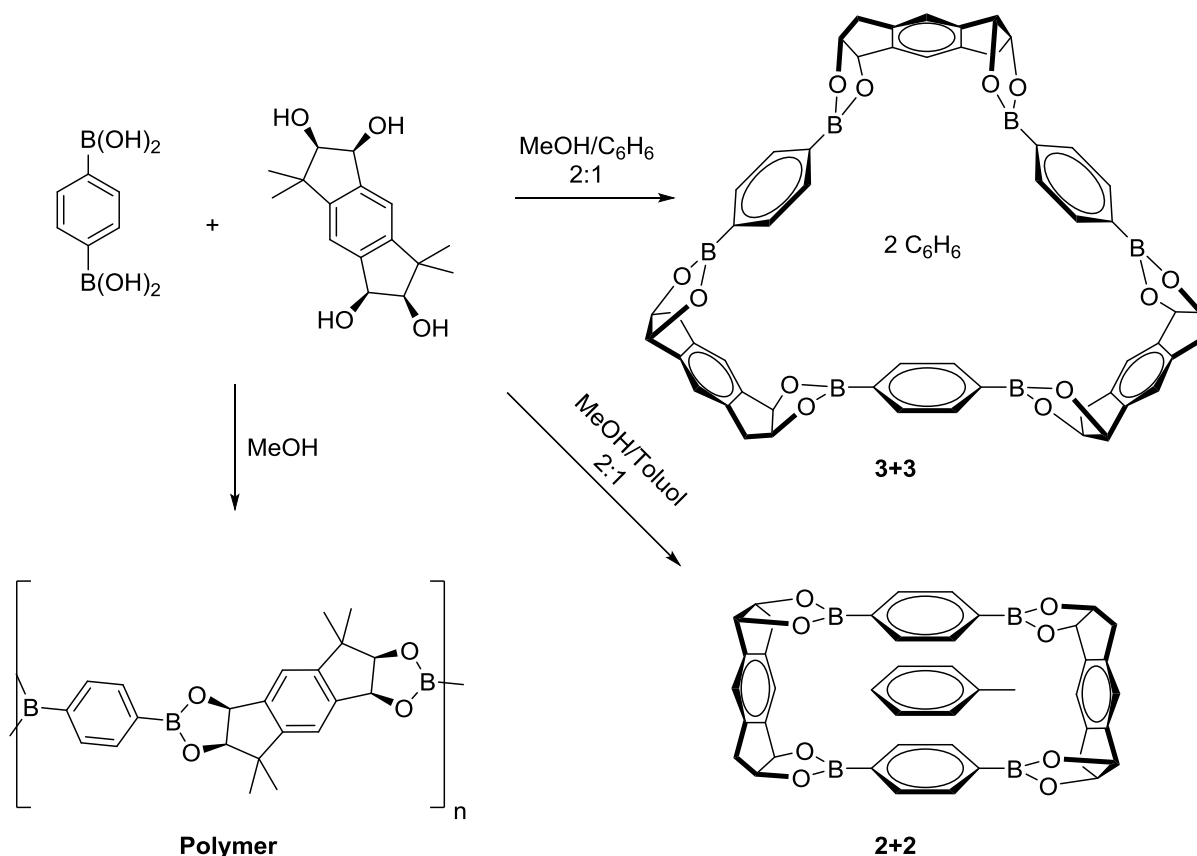


Schema 4: Selbstassemblierung eines Makrozyklus aus 2-Formylboronsäure, *p*-Phenyldiamin und Pentaerythrit in DMF.^[147]

Die Bildung des Makrozyklus beruht auf einer von JAMES erstmals beschriebenen Drei-Komponenten-Reaktion zur Bestimmung der Enantiomerenreinheit von chiralen Aminen.^[148] Dabei wird mit 2-Formylphenylboronsäure ein Imin und ein Boronsäureester gebildet. Das freie Elektronenpaar des Imin-Stickstoffs koordiniert dabei an das Bor-Atom. Dass sowohl elektronenreichere Imine, als auch Diol mit höherer Affinität zur Boronsäure, zu höheren Ausbeuten des Makrozyklus führen ist dadurch zu erklären. Dies führt zu einer deutlichen Einschränkung dieser Methode im Hinblick auf die Verwendung verschiedener Diole und Amine.^[147]

TAKAHAKI gelang zu ersten Mal die Bildung von Käfigstrukturen. Dazu wurde die Bindung zwischen einer divalenten Boronsäure und einem rigiden, divalenten Diol ausgenutzt (Schema 5).^[149]

Einleitung



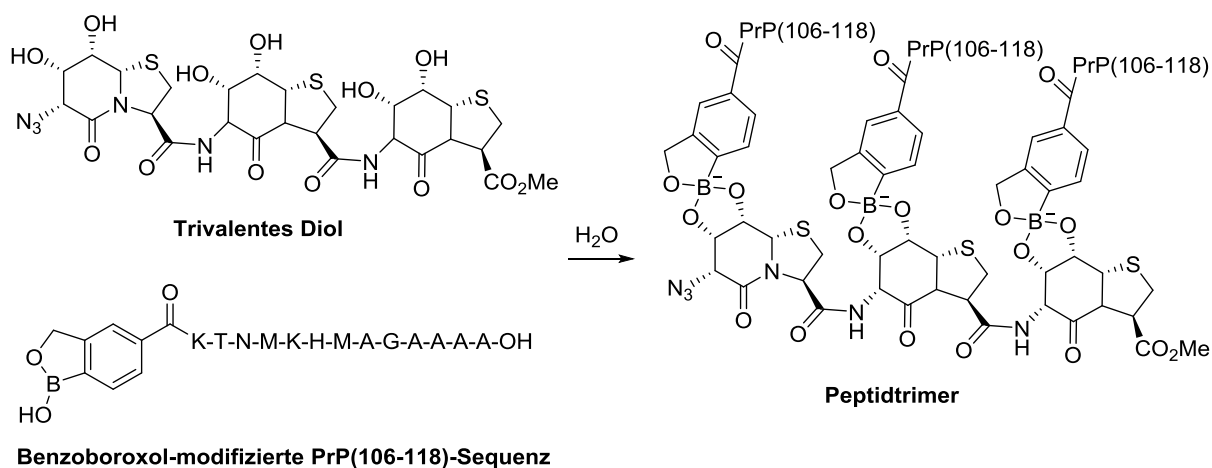
Schema 5: Veresterung einer divalenten Boronsäure mit einem divalenten Diol. Mit MeOH als Lösungsmittel bildet sich ein Polymer. Mit MeOH und Benzol bzw. Toluol im Verhältnis 2:1 bildet sich ein Käfig der Diol-Boronsäure-Zusammensetzung von 3+3 bzw. 2+2. In den Käfig der Zusammensetzung 3+3 sind zwei Benzol-Moleküle und in den Käfig der Zusammensetzung 2+2 ein Toluol-Molekül eingeschlossen. Die Methylgruppen des Diols sind in Di- und Trimer aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht gezeichnet.

Durch die Wahl des Lösungsmittels ist es möglich die Geometrie des gebildeten Käfigs zu beeinflussen. Außerdem ist es möglich, das im Käfig eingeschlossene Molekül gegen andere Aromaten wie Azulen auszutauschen ohne die Käfiggeometrie zu ändern.^[149–151] KOBAYASHI entwickelte dieses Konzept weiter und nutzte tetravalente Boronsäuren um deutlich größere, symmetrische Käfigstrukturen aufzubauen und sterisch anspruchsvollere Aromaten darin einzuschließen.^[152–154]

Der Aufbau von Käfigstrukturen in wässriger Lösung gelang 2015 das erste Mal. Dazu wurde ein Kation als Templat für eine Assemblierung genutzt. Ammonium-Kationen erwiesen sich dabei als besonders geeignet.^[155]

Eine Selbstassemblierung von Peptidstrukturen in wässriger Lösung mit multivalenten Diolen und Benzoboroxol-modifizierten Peptiden, ohne zusätzliche Komponenten, gelang WUTTKE 2017.^[156, 157] Dazu wurde eine oligomerisierbare,

peptidische Diolstruktur und die Epitopsequenz des Prionpeptids (PrP(106-118)), welche N-terminal mit einem Benzoboroxol modifiziert wurde, verwendet um in einem Selbstassemblierungsprozess Epitopoligomere aufzubauen (Schema 6).^[157-160]



Schema 6: Trimerisierung der Benzoboroxol-modifizierten Epitopsequenz des Prionpeptids mittels eines trivalenten Diol-templates in wässriger Lösung.^[157]

Diese Beispiele zeigen eine große Relevanz von Boronsäure-Derivaten und Diolstrukturen bei der Selbstassemblierung von Makromolekülen. Dabei stellt eine Selbstassemblierung in wässriger Umgebung durch die schlechtere Affinität zwischen Diol und Boronsäure bis heute eine große Herausforderung dar, was besonders durch die wenigen Literaturbekannten Beispiele besonders deutlich wird.

1.3. Kieselsäure

Kieselsäure stellt mit einer Summenformel von $Si(OH)_4$ die Strukturell einfachste Silica-Verbindung dar.^[161] Silica kann im Allgemeinen als Kondensationsprodukt von Kieselsäure, mit der Summenformel $SiO_2 \cdot n H_2O$ aufgefasst werden. Nicht verwechselt werden darf Silica mit Silicaten, also Salze oder Ester der Kieselsäure oder deren Oligo- bzw. Polymere. Mit einem Anteil von 17% (Silizium) und 32% (Sauerstoff) stellen diese beiden Elemente die Hälfte der Masse der auf der Erde vorkommenden Elemente.^[162] Da Silizium in der Natur nicht gediegen vorliegt, ist nahezu das gesamte Silizium auf der Erde in Form von Silica bzw. Silicaten

gebunden. Kieselsäure hingegen liegt in der Natur nur in Gewässern in kleinsten Konzentrationen vor (<100 ppm), bei welchen keine Autopolykondensation einsetzen kann.^[161]

1.3.1. Biomineralisierung

Der Prozess komplexe, anorganische Strukturen an organischen Templaten zu bilden, wird als Biomineralisation bezeichnet.^[163] Die in Gewässern gelöste Kieselsäure ist dabei Ausgangspunkt für Biomineralisierungsprozesse, wie sie bei verschiedenen Einzellern wie Diatomeen und Radiolarien, sowie Mehrzellern wie Glasschwämmen zu beobachten ist.^[95, 164, 165] Dabei sind Diatomeen, hinsichtlich ihrer Fähigkeit mittels Biomineralisation ein Exoskelett aufzubauen, die am besten untersuchten Organismen (Abbildung 6).

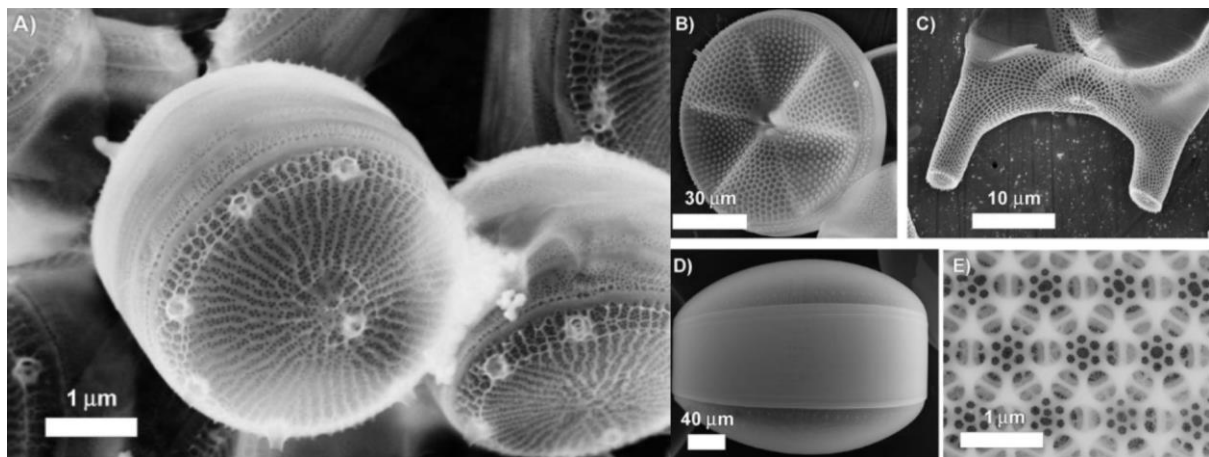


Abbildung 6: SEM-Aufnahmen verschiedener Diatomeen. A) *Thalassiosira pseudonana*. B) *Actinoptychus spec.* C) *Eucampia zodiacus*. D) *Coscinodiscus granii*. E) Zellwand von *Eucampia zodiacus*. Entnommen aus: *ChemBioChem* **2008**, 9, 1187-1194.^[166]

In Diatomeen spielen dabei LCPAs und Silaffine, posttranslational stark modifizierte Peptide, innerhalb des *silica deposition vehicle* eine entscheidende Rolle beim Aufbau dieser Silica-Strukturen.^[167–171]

In Glasschwämmen ist die Biomineralisation von Kieselsäure nicht nur am Aufbau von Exoskeletten beteiligt, sondern auch am Aufbau von glasartigen Nadeln, welche die Befestigung am Untergrund ermöglichen.^[95] Diese Nadeln weisen dabei besondere optische Eigenschaften auf und sind mechanisch extrem belastbar.^[95, 172] Die Nadeln von *Hyalonema sieboldi* bestehen zu 30% aus organischem Material. Studien konnten zeigen, dass es sich dabei um Kollagen Typ I handelt.^[95]

Erstaunlich ist dabei der hohe Grad an posttranslationalen Hydroxylierungen. Das Verhältnis von Prolin zu Hydroxyproline beträgt 3:4 und das von 3-Hydroxyprolin zu 4-Hydroxyprolin 1:3. Also sind 100% der Proline in Yaa- und 33% der Proline in Xaa-Position in 4- bzw. 3-Position posttranslational hydroxyliert, wobei nur die Xaa-Yaa-Gly-Repetiereinheiten betrachtet wurden. Ähnliches wurde auch schon für andere Glasschwammarten berichtet (Tabelle 5).^[173]

Tabelle 5: Verhältnis zwischen Prolin und hydroxylierten Prolinen, sowie das Verhältnis von Hydroxylierungen in 3- und 4-Position verschiedener, aus Glasschwämmen isolierter, Kollagene.^[95, 173]

	<i>H. sieboldi</i> ^[95]	<i>G. cydomum</i> ^[173]	<i>C. remiformis</i> ^[173]
Pro:Hyp	3:4	3:5	3:5
3-Hyp: 4-Hyp	1:3	1:3	2:5

Auch in Diatomeen findet sich Kollagen mit einem erstaunlich großen Hydroxylierungsgrad. Hier konnte auch 3,4-Dihydroxyprolin, also ein posttranslational doppelt hydroxyliertes Prolin-Derivat isoliert werden.^[174, 175] Es kann also ein Zusammenhang zwischen stark posttranslational hydroxylierten Kollagen und der Fähigkeit als Templat für die Kieselsäurefällung zu fungieren, hergestellt werden, wobei einer Hydroxylierung in 3-Position eine besondere Bedeutung beigemessen wird.^[176, 177] Da die Schützung der Hydroxygruppen allerdings nicht zum vollständigen Verlust der Fähigkeit der Kieselsäurefällung führt, ist allerdings davon auszugehen, dass auch anderen Verbindungen, wie beispielsweise Silicatein, welches ebenfalls in Glasschwämmen gefunden werden kann, an einer Kieselsäure beteiligt sind und damit die genaue Rolle von Kollagenen in der Kieselsäurefällung nicht abschließend geklärt ist.^[95, 178, 179]

1.3.2. Kollagen-Silica-Hybridmaterialien

Organisch-anorganische-Hybridmaterialien aus Silica und Kollagen haben erstaunliche Eigenschaften, was zu einem großen Interesse an der Synthese solcher Materialien führt.^[95, 96, 180] Dabei sind jedoch zwei Dinge elementar. Zum einen wird die Synthese solcher Materialien ausschließlich mit Kollagen natürlichen Ursprungs (Kollagen Typ-I) durchgeführt, zum anderen findet nur in wenigen Fällen eine direkte Kieselsäurefällung auf der Oberfläche der Kollagen-Fibrillen statt.^[181] Meistens wird Sol-Silica, also durch Polykondensation hergestellte Silica-Partikel mit einem

Einleitung

Durchmesser von 1-100 nm, zusammen mit Kollagen-Fibrillen als Templat in einem Sol-Gel-Prozess eingesetzt.^[182–184] Das Kollagen-Silica-Hydrogel kann weiter durch Trocknung bzw. Gefriertrocknung, je nach Einsatzgebiet, zu Xerogelen oder anderen Strukturen prozessiert werden (Abbildung 7).^[180, 181]

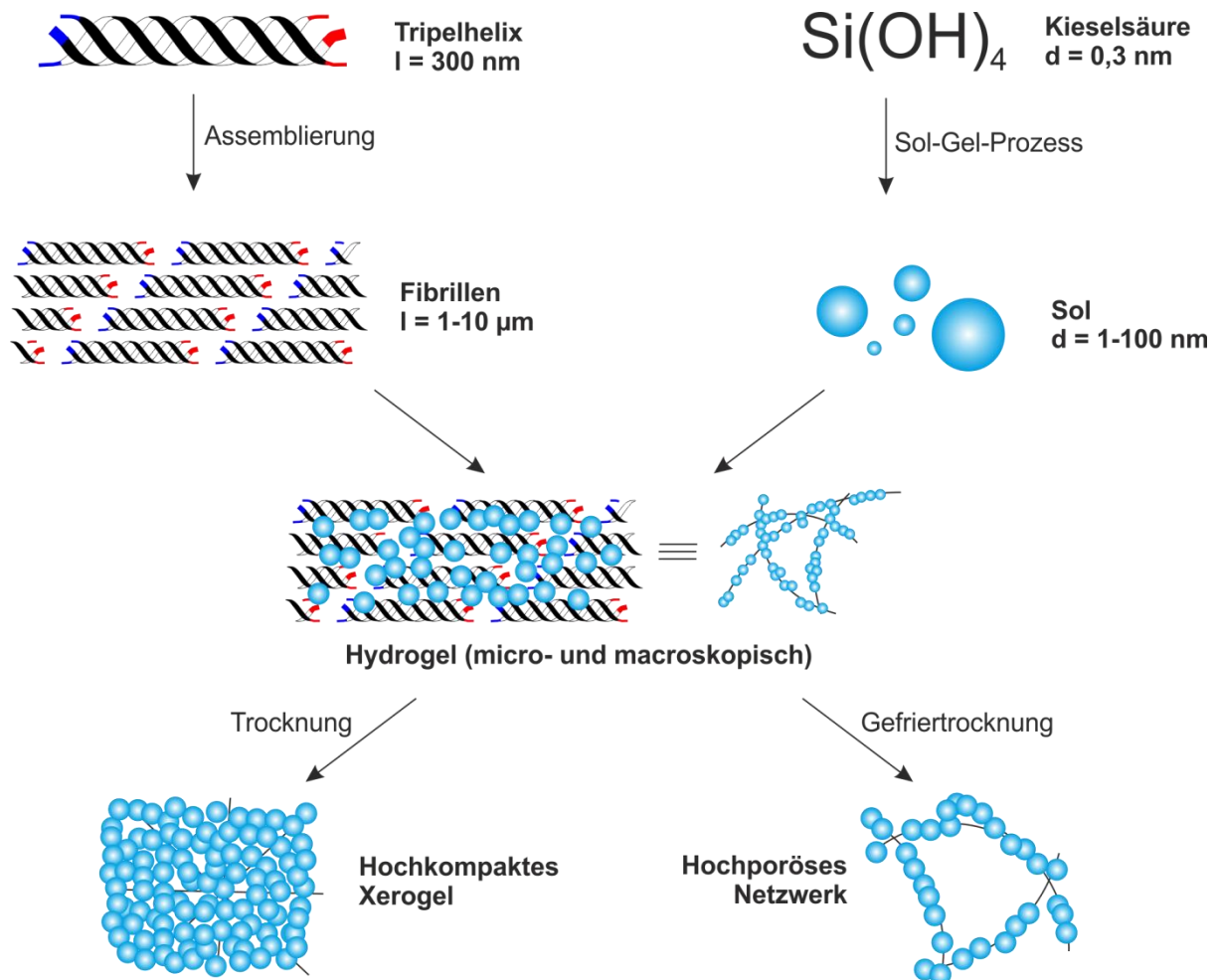


Abbildung 7: Bildung eines Kollagen-Silica-Hydrogels aus Silica-Sol und Kollagen-Fibrillen. Durch Trocknung oder Gefriertrocknung kann dieses Hydrogel in hochkompaktes Xerogel oder ein hochporöses Netzwerk überführt werden. Die Eigenschaften wie Festigkeit oder Belastbarkeit der verschiedenen Strukturen unterscheiden sich dabei stark.^[96, 180, 183]

Im Gegensatz zu Kollagen natürlichen Ursprungs, ist über die Fällungseigenschaften von synthetischen Kollagen kaum etwas bekannt. Von WEIHER konnte 2013 erstmals gezeigt werden, dass auch Kollagen-Modellpeptide in der Lage sind, Kieselensäure zu fällen.^[87] Dies bietet den Vorteil, im Gegensatz zu natürlichem Kollagen, exakte Kenntnis über Zusammensetzung, Struktur und Modifikationen der Kollagen-Peptide zu haben. Das Ziel dieses Ansatzes ist, Hybridmaterialien statt aus Silica-Sol und Kollagen-Fibrillen direkt aus Kollagen-Tripelhelix und Kieselensäure zu bilden.

2. Aufgabenstellung

Die Rolle von PTMs an Kollagenen isoliert zu charakterisieren ist fundamental, um ihren Einfluss zu verstehen. Die Hydroxylierung von Prolinen in Kollagen-Modellpeptiden hat dabei einen großen Anteil an der Stabilität der gebildeten Tripelhelix.^[74, 185–187] Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine Methode entwickelt werden, 3,4-Dihydroxyprolin in Kollagen Modell Peptide zu inkorporieren. Dabei sollte vor allem das Problem der schlechten Acylierbarkeit und der aufwendigen Synthese in Form einer *late-stage* Modifikation adressiert werden.^[188] Das Einführen einer 1,2-Dihydroxyfunktion zu einem späten Zeitpunkt der Synthese könnte zudem weitere Dihydroxyprolin-haltige Peptide zugänglich machen, stellt aber hohe Anforderungen an Chemo- und Stereoselektivität.

Im Weiteren sollte eine 1,2-Diolstruktureinheit verwendet werden um, mittels reversiblen Bindens eines Boronsäure-Derivates, eine kovalente Verknüpfung der Stränge der Tripelhelix zu erreichen. Diese Art der Verknüpfung ist dabei eine konsequente Weiterentwicklung bereits bestehender kovalent irreversibler Konzepte zum Verknüpfen von Kollageneinzelsträngen, z.B. mittels Amidin, Estern oder Disulfiden.^[23, 86–88, 90] Dieser Ansatz ist zudem der erste, bei dem nicht nur eine Assemblierung der drei Einzelstränge zur Tripelhelix in Lösung stattfindet, sondern eine Assemblierung von drei Einzelsträngen und einem *cap* zu einer kovalent verknüpften (*capped*) Tripelhelix. Eine solches *capping* ist außerdem ein großer Schritt in Richtung eines modularen Aufbaus von verknüpften Kollagen-Modellpeptide, da nicht durch großen synthetischen Aufwand, sondern durch eine kooperative Assemblierung in Lösung eine kovalente Verknüpfung der Einzelstränge erreicht wird.

Die so zugänglichen Kollagen-Modellpeptide sollten daraufhin mittels NMR-spektroskopischer Methoden charakterisiert werden. Dabei war vor allem eine auf NMR-Spektroskopie basierende Schmelzpunktbestimmung von großer Bedeutung, da hier der Schmelzvorgang auf molekularer Ebene zu beobachten sein sollte, welche mittels CD-Spektroskopie nicht zugänglich ist. Die Ableitung einer generellen Methode zur Schmelzpunktbestimmung mittels NMR-Spektroskopie ist ebenfalls wünschenswert, da dies bisher nur für Spezialfälle beschrieben ist.^[65]

Aufgabenstellung

Nicht alle Kollagen-Modellpeptide verfügen über die Eigenschaft der Kieselsäurefällung. Trotzdem spielen Kollagenstrukturen eine Schlüsselrolle in der Biomineralisierung bei verschiedenen Organismen.^[95, 174] Daher sollte ebenfalls versucht werden einen Zusammenhang zwischen der Struktur der Kollagen-Modellpeptide und ihrer Eignung in der Kieselsäurefällung herzustellen, wobei geklärt werden sollte, ob sich auch andere in der Biomineralisation involvierte Verbindungen in ein solches Erklärungsmodell einordnen lassen.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1. Modifikationen des Kollageneinzelstrangs

Wie bereits in der Einleitung (Kapitel 1.1.4.) beschrieben, eignet sich eine Modifikation des Kollageneinzelstrangs dazu, gezielt den Einfluss von PTMs auf die Stabilität der Tripelhelix zu untersuchen. Wie in der Literatur, sind dabei die Schmelztemperatur, als auch der Anteil der zur Tripelhelix gefalteten Einzelstränge das ausschlaggebende Kriterium für die Stabilität.^[25, 189] Grundsätzlich kann zwischen zwei verschiedenen Arten der Modifikation unterschieden werden. Zum einen einer globalen Modifikation des Einzelstranges, also der identischen Modifikation an jeder einzelnen Repetiereinheit.^[65, 70, 71, 190] Zum anderen einer punktuellen Modifikation des Einzelstranges. Diese punktuelle Modifikation kann prinzipiell an jeder Repetiereinheit vorgenommen werden, jedoch haben so genannte *host-guest* Kollagen-Modellpeptide, welche die Modifikation an einer Repetiereinheit im Zentrum des Einzelstranges aufweisen, eine besondere Aussagekraft.^[56, 82, 191] Durch die Lage im Zentrum der Tripelhelix ist der Einfluss einer solchen auf die Gesamtstruktur maximal.^[42] Außerdem lässt sich bei einer solchen punktuellen Modifikation direkt der Vergleich zu einer Referenz herstellen, sodass auch verschiedenste Modifikationen miteinander verglichen werden können. Aus diesen Gründen wurden in dieser Arbeit *host-guest* Kollagen-Modellpeptide synthetisiert und untersucht. (Abbildung 8)

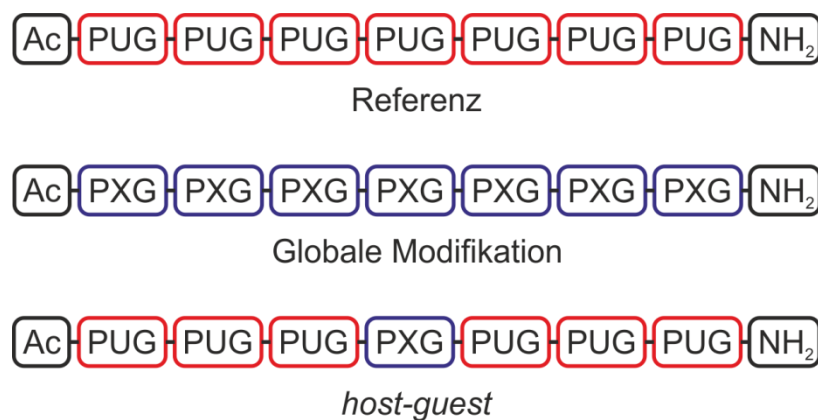


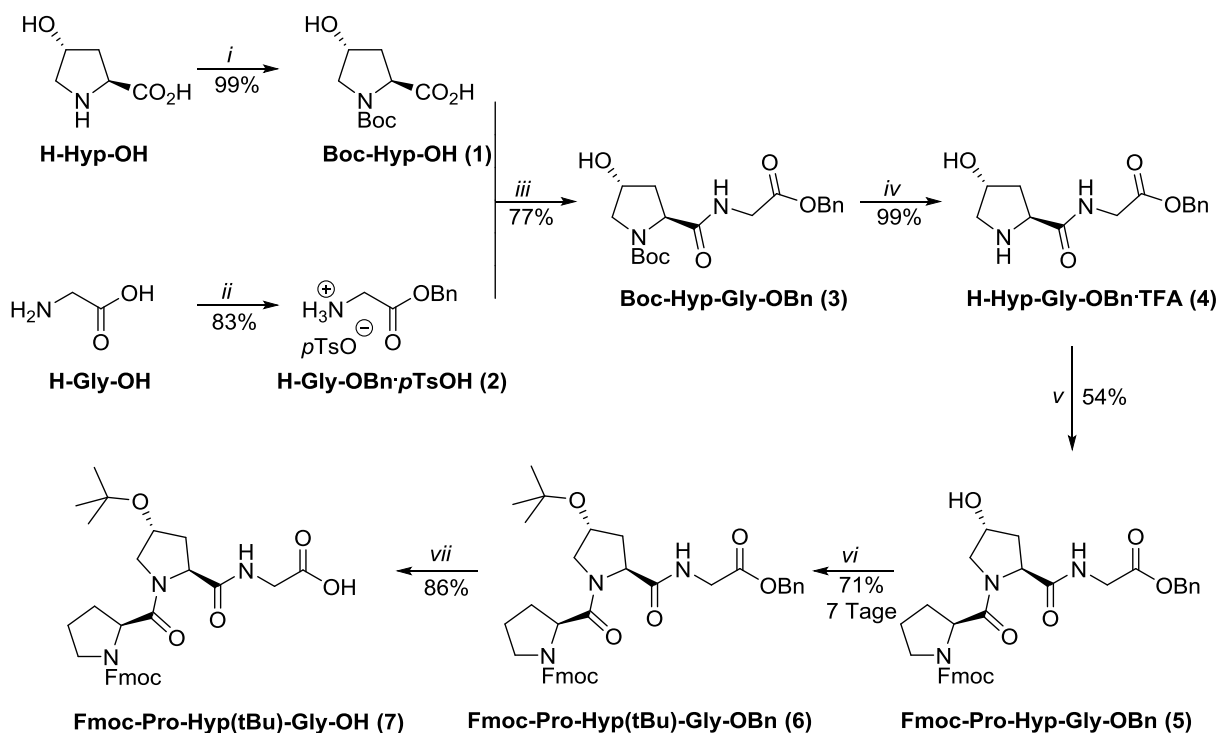
Abbildung 8: Schematischer Vergleich zwischen den beiden beschriebenen Modifikationsmethoden. **Oben:** Referenz Kollagen-Modellpeptid mit sieben Pro-Hyp-Gly-Repetiereinheiten und Acetylierung am N- sowie Carboxamid am C-Terminus. **Mitte:** Globale Modifikation in Yaa-Position aller sieben Repetiereinheiten. **Unten:** *host-guest* mit einer Modifikation der Yaa-Position der mittleren Repetiereinheit.

Als Modellsystem wurde hier das Kollagen-Peptid mit sieben Repetiereinheiten gewählt. Das hat den Vorteil, dass die Schmelztemperatur der Tripelhelix in der Mitte des Messfensters einer wässrigen Lösung (0 bis 100 °C) liegt und damit der Einfluss von Modifikationen bestmöglich untersucht werden kann. Eine Verkürzung der Sequenz führt zu signifikant geringeren Schmelztemperaturen, während eine Verlängerung der Sequenz eine deutlich erhöhte Schmelztemperatur zur Folge hat.^[192, 193] In beiden Fällen führt dies dazu, dass man potentiell nicht mehr den gesamten Schmelzbereich untersuchen kann. Außerdem wurde die N-terminale Ladung durch Acetylierung und die C-terminale Ladung durch ein Carboxamid neutralisiert, um Wechselwirkungen durch permanente Ladungen ausschließen zu können.^[25]

3.1.1. Synthese der PUG-Repetiereinheit und optimierte SPPS

Im Vergleich zur klassischen Festphasenpeptidsynthese, bei der jede Aminosäure einzeln gekuppelt wird, bietet sich für die Synthese von Kollagenen die Kupplung von Peptidfragmenten an, welche bereits von PROCKOP *et al.* im Jahr 1972 erstmals beschrieben wurde.^[187, 194] Dabei werden im Falle von Kollagen-Modellpeptiden entsprechend geschützte Pro-Hyp-Gly-Fragmente gekuppelt bis das gewünschte Peptid aufgebaut ist. Auch Synthesen mit Gly-Pro-Hyp-Fragmenten sind bekannt.^[195] Die Synthese mittels Fragmentkupplung löst dabei mehrere Probleme. Zum einen weist das 4-Hydroxyprolin eine stark verringerte Acylierbarkeit in der SPPS auf, welche zu einer Vielzahl von Deletionsmutanten führen und damit die Ausbeute massiv verringern würde.^[63, 188] Dieser Nachteil wird dabei auf die Ebene der Fragmentsynthese verschoben. Zum anderen führt die Kupplung von Pro-Hyp-Gly-Fragmenten zu einer deutlich verringerten Anzahl an Kupplungsschritten. Außerdem führt eine Fehlkupplung immer zur selben, um eine Repetiereinheit verkürzten, Sequenz, was eine abschließende Reinigung des Rohprodukts erheblich vereinfacht. Basierend auf früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe wurde die Synthese des Tripeptidfragments **7**, welches für die SPPS geeignet, ist in 7 Stufen dargestellt (Schema 7).^[196, 197] Ausgangspunkt der Synthese sind dabei Hydroxyprolin und Glycin.

Ergebnisse und Diskussion

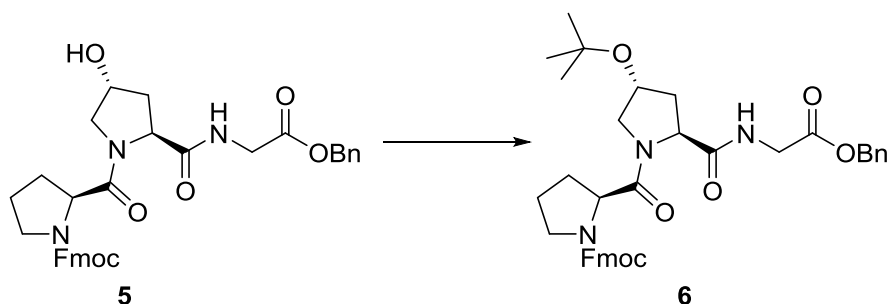


Schema 7: Synthese des für die SPPS geeigneten Tripeptidfragments **7** über 7 Stufen.^[196, 197] (i) Boc_2O , NaOH, THF/ H_2O , 16 h, RT; (ii) BnOH, $p\text{TsOH}$, Toluol, 19 h, reflux; (iii) HBTU, HOBt, DIPEA, DMF, 20 h, RT; (iv) TFA, 2 h, RT; (v) Fmoc-Pro-OH, HBTU, HOBt, DIPEA, DMF, 20 h, RT; (vi) Isobuten (8% in DCM), H_2SO_4 , 7 d, RT; (vii) H_2 (10 bar), Pd/C (5%), 66 h, RT.

Wie in Schema 7 deutlich zu sehen ist, sind es zwei Transformationen, welche die Synthese des SPPS-Bausteins **7** limitieren. Zum einen die Peptidkupplung in Lösung zum Tripeptid **5** mit einer Ausbeute von 54% und zum anderen die Bildung des *tert*-Butylethers **6** in einer moderaten Ausbeute von 71% aber mit einer Reaktionszeit von sieben Tagen. Acylierungen von Hydroxyprolin-Derivaten sind fast immer mit schlechten bis moderaten Ausbeuten verbunden, was dazu führt, dass alle etablierten Synthese zum SPPS-Baustein **7** oder ähnlichen Derivaten den Schritt der Acylierung entweder möglichst an den Anfang der Synthese stellen oder aber die schlechte Ausbeute durch eine verringerte Stufenzahl kompensieren.^[63, 196–198] Den Schritt mit der größten zeitlichen Limitierung stellt allerdings die Bildung des *tert*-Butylethers mit einer Reaktionszeit von sieben Tagen dar. Eine Optimierung der bisherigen Reaktionsbedingungen ausgehend von Isobuten wurde jedoch als wenig zielführend erachtet da die besten Ausbeuten mit einer 24%igen Isobutenlösung in DCM, hergestellt aus einkondensiertem Isobuten, erreicht wurden.^[196, 197] Das Benutzen einer 8%igen Isobutenlösung in DCM führte in allen Fällen zu geringeren Ausbeuten, was die Isobutenkonzentration als einen kritischen Parameter

erscheinen lässt. Zum gewünschten Ergebnis führte dabei eine Methode zur Bildung von *tert*-Butylethern von SAMBRI *et al.*. Dabei gelang es, eine Vielzahl von Strukturell sehr unterschiedlichen Alkoholen mittels Boc_2O und $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ in guten bis sehr guten Ausbeuten und milden Reaktionsbedingungen in die entsprechenden *tert*-Butylether zu überführen.^[199] Die Reaktionsbedingungen ließen sich dabei auf Alkohol **5** übertragen wobei durch eine Erhöhung der Äquivalente von Boc_2O eine nahezu quantitative Ausbeute bei einer Reaktionszeit von 14 Stunden *tert*-Butylether **6** erhalten werden konnte. Die bisherigen und optimierten Reaktionsbedingungen, sowie Ausbeuten der Umsetzung zu **6** sind in Tabelle 6 aufgeführt. Angemerkt sei dabei, dass sich DCM Lösungen mit einem Isobutenanteil bis maximal 8% kommerziell erhältlich sind (Eintrag 2). Sind höhere Isobutenkonzentrationen notwendig, muss eine entsprechende Lösung durch Einkondensieren von gasförmigen Isobuten hergestellt werden (Eintrag 1).

Tabelle 6: Verschiedene Reaktionsbedingungen für die Umsetzung zum *tert*-Butylether **6**.



Eintrag	Lösungsmittel	Reagenzien	Reaktionszeit	Temp.	Ausbeute
1 ^[196]	DCM	1,20 Äq Isobuten (24% in DCM) 0,80 Äq H_2SO_4	7 d	RT	71%
2	DCM	4,80 Äq Isobuten (8% in DCM) 0,80 Äq H_2SO_4	7 d	RT	61%
3	DCM	5,00 Äq Boc_2O 10 mol% $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$	5 h	40 °C	Kein Umsatz
4	$\text{Boc}_2\text{O}/\text{DCM}$ 2:1	50,0 Äq Boc_2O 35 mol% $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$	14 h	40 °C	99%

Die SPPS, in welcher der Tripeptid-Baustein **7** eingesetzt wurde, lässt sich in einer großen Zahl von Parametern variieren. Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit des Bausteins **7** ist eine systematische Variation einzelner Parameter nicht zielführend. Stattdessen wurde versucht, durch gezielte Variation einzelner Parameter ausgehend von bekannten SPPS-Protokollen die Effizienz der SPPS, also höhere Ausbeuten bei verringertem Einsatz des Tripeptid-Bausteins **7**, zu erreichen.^[63, 196, 198] Da für die SPPS von Kollagen-Modellpeptiden die Aggregation auf dem polymeren Träger den größten Anteil an schlechten Ausbeuten zu haben scheint, wurde das Unterdrücken dieser Aggregation als essenziellste Voraussetzung für eine effiziente Synthese angesehen. Als polymerer Träger für die SPPS wurde dabei ein Rink-Amid-Harz gewählt, da man nach saurer Abspaltung direkt das gewünschte C-terminale Carboxamid erhält.^[198, 200] Dabei wurde die Beladung möglichst klein gewählt (0,35 mmol/g), um Aggregation auf dem polymeren Träger zu verhindern. Des Weiteren wurde die Temperatur für Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe und Kupplung von Tripeptideinheiten auf 70 °C erhöht, da bekannt ist, dass eine Erhöhung der Temperatur zu einer deutlich verkürzten Kupplungszeit führt, ohne die Reinheit oder Ausbeute zu beeinflussen.^[201–203] Darüber hinaus wurden im Arbeitskreis bereits gute Erfahrungen mit DMSO als Lösungsmittel bei der Synthese von Peptiden, welche zur Aggregation neigen, gemacht.^[202] Daher wurde zum Abspalten der Fmoc-Schutzgruppe eine 30%ige Piperidinlösung in DMSO mit dem Zusatz von 1% Triton X-100 verwendet. Für die Kupplung wurden HATU und HOAt sowie DIPEA als Base verwendet. Als Lösungsmittel diente ein Lösungsmittelgemisch als Toluol und DMSO im Verhältnis 3:1. Außerdem wurde die zu kuppelnde Aminosäure 10 min bei Raumtemperatur voraktiviert, bevor die eigentliche Kupplung am polymeren Träger für 30 min bei 70 °C durchgeführt wurde. Durch diese Optimierungen des SPPS-Protokolls war es dabei nicht nur möglich Ausbeute sowie Reinheit des Rohpeptides zu erhöhen, sondern auch die benötigte Menge Fmoc-geschützten Bausteins **7** deutlich zu reduzieren. In Tabelle 7 sind gängige Bedingungen für die Kollagensynthese mittels SPPS und deren Ausbeuten sowie Reinheiten aus der Literatur der hier beschriebenen gegenübergestellt. Die Daten beziehen sich alle auf die Kupplung von sieben Tripeptideinheiten zur entsprechenden (PUG)₇-Einheit.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 7: Gegenüberstellung verschiedener Bedingungen für die Kupplung von sieben Tripeptideinheiten mittels SPPS.

Parameter\Eintrag	1 ^[196]	2 ^[198]	3
Baustein	4,0 Äq. 7	4,5 Äq.	2,0 Äq. 7
	Fmoc-PU ^{TBDPS} G-OH		
Reagenzien	4,0 Äq HBTU	4,5 Äq. HCTU	3,0 Äq. HATU 3,0 Äq. HOAt 6,0 Äq. DIPEA
	20 Äq DIPEA	13,5 Äq. DIPEA	
Lösungsmittel	DMF	DMF	Toluol/DMSO 3:1
Temperatur	RT	RT	70 °C
Zeit	30 min	90 min	30 min
Fmoc-Abspaltung	25% Piperidin in DMF	40% Piperidin in DMF	30% Piperidin in DMSO + 1% Triton X-100
Temperatur	RT	RT	70 °C
Zeit	15 min	13 min	20 min
Rohpeptid ^a	12 mg	34 mg	49 mg
Reinheit ^b	n.b.	60%	79%
Ausbeute ^c	n.b	12%	25%

^aBezogen auf einen 0.05mM Ansatz. ^bBetimmt mittels RP-HPLC aus dem Rohpeptid. ^cNach Reinigung mittels semi-präparativer RP-HPLC

Neben der Synthese des SPPS-kompatiblen Fragments **7** und der Kupplung der Tripeptidfragmente auf dem polymeren Trägermaterial ist die Reinigung des Rohpeptids mittels semipräparativer RP-HPLC von essenzieller Bedeutung für die Ausbeute, aber vor allem auch die Reinheit des Peptides. Gegenüber der analytischen RP-HPLC ergeben sich für die semipräparative Reinigung eine Reihe von Änderungen. Zum einen ist der Druck deutlich geringer (120 bar statt 400 bar) bei gleichzeitiger Erhöhung des Durchflusses (7,5 mL/min statt 0,45 mL/min). Zum anderen ist die Konzentration des zu Reinigenden Peptids deutlich höher (5-20 mg/mL). Das bei weitem größte Problem bei der Reinigung von Kollagen-Modellpeptiden ist allerdings die Bildung der charakteristischen Tripelhelix bzw. höheren Aggregaten. Dies führt zu einer deutlichen Verbreiterung der Peaks was eine Reinigung, also dem Abtrennen von Verunreinigungen, erschwert oder sogar die Isolation eines Peptids mit hoher Reinheit, unmöglich macht. Hieran wird

noch einmal deutlich, warum bereits eine Optimierung des SPPS-Protokolls und damit eine Synthese von Peptiden mit möglichst hoher Reinheit auf Stufe des Rohpeptids, sowie eine Minimierung möglicher Nebenprodukte für die nachfolgende Reinigung von großer Bedeutung ist. Da die Bildung der Tripelhelix thermisch reversibel verläuft, erschien eine Reinigung der Rohpeptide bei erhöhter Temperatur am vielversprechendsten. Da für die zur Verfügung stehende semipräparative RP-HPLC kein Säulenofen verfügbar war, wurde die Säule mit Hilfe eines Wasserbades erhitzt. Das führte zu einer Temperatur zwischen 45 °C und 55 °C, also im Mittel von 50 °C. Zu beachten ist jedoch, dass durch die erhöhte Temperatur der Druck infolge der geringeren Viskosität abnimmt, was die Trennleistung potentiell negativ beeinflussen kann.^[204, 205] Letztlich ließ sich durch Erhöhen der Temperatur eine deutlich verbesserte Trennleistung für Kollagen-Modellpeptide erreichen. Während bei Raumtemperatur keine ausreichende Abtrennung der Nebenprodukte erreicht werden konnte, was nur zu kleinen Mengen Peptid mit ausreichender Reinheit ($\geq 95\%$) führte, ließen sich durch Erhöhen der Temperatur auf etwa 50 °C grundliniengetrennte Peaks erhalten und damit alle Verunreinigungen abtrennen. (Abbildung 9)

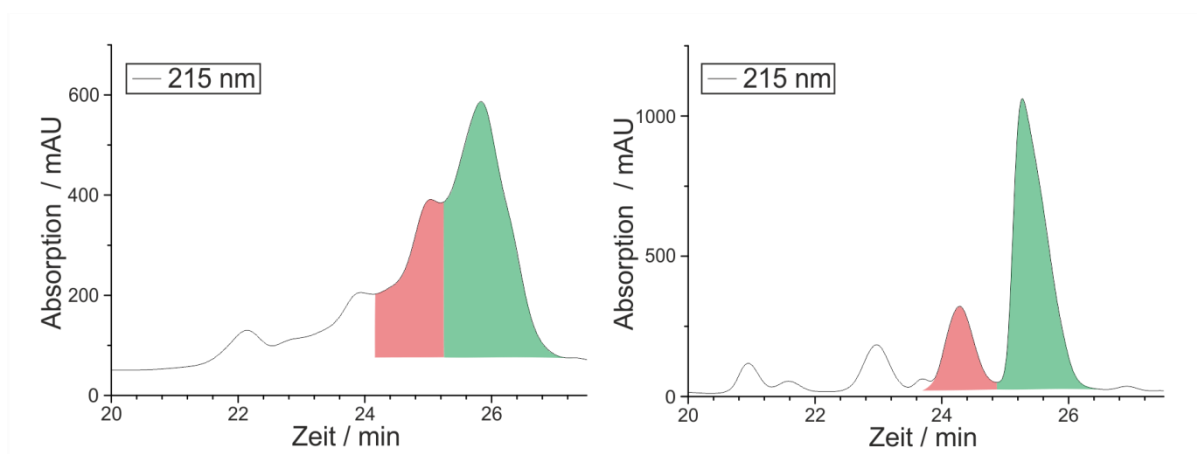


Abbildung 9: Chromatogramme aus der semipräparativen Reinigung von 10 mg Kollagen-Modellpeptid. **Links:** Chromatogramm bei RT mit nicht vollständig getrennten Peaks. Dies führt zu Produktfraktionen mit niedriger Reinheit, da das Nebenprodukt nicht ausreichend abgetrennt werden kann. **Rechts:** Chromatogramm bei 50 °C mit grundliniengetreten Peaks. Dies führt zu Produktfraktionen mit hoher Reinheit. Chromatographische Bedingungen: 7,5 mL/min, 2–30% B in 60 min, A = Wasser + 0,1% TFA, B = Acetonitril + 0,085% TFA.

Mit den Optimierungen der Bausteinsynthese, des SPPS-Protokolls, sowie der Reinigung des Rohpeptids, gelang es das Referenz Kollagen-Modellpeptid Ac-(PUG)₇-NH₂ (**8**) in einer hohen Gesamtausbeute mit hervorragender Reinheit darzustellen. Dabei stellt die drastische Reduktion des benötigten Tripeptid-

Bausteins **7** in Kombination mit einer optimierten Synthese, welche zu stark erhöhten Ausbeuten nach semipräparativer Reinigung führt, im Vergleich zu etablierten Methoden eine beachtliche Weiterentwicklung dar.^[63, 198]

3.1.2. Charakterisierung von Kollagen-Modellpeptiden

Für die Charakterisierung von Kollagen-Modellpeptiden stellt der Schmelzpunkt einen besonders aussagekräftigen Parameter dar, da er in direktem Zusammenhang mit der Struktur steht und kleine Veränderungen bereits einen großen Effekt auf diesen haben kann. In der Literatur sind viele verschiedene Protokolle zur Bestimmung der Schmelztemperatur, also die Temperatur, bei der die Hälfte der tripelhelikalen Spezies in Einzelstränge aufgeschmolzen ist, beschrieben.^{[24, 53, 65, 84,}

86, 90, 189, 206–208]

Dabei stellen CD und NMR-Methoden die beiden prominentesten Methoden dar, wobei CD-Spektroskopie in den meisten Untersuchungen Anwendung findet. Um Grenzen, sowie Vor- und Nachteile einer Schmelzpunktbestimmung mittels CD- bzw. NMR-Spektroskopie aufzuzeigen, wurden Untersuchungen mit Kollagen-Modellpeptid Ac-(PUG)₇-NH₂ (**8**) durchgeführt. Das hat vor allem den Vorteil, dass es als Referenzverbindung leicht zugänglich ist und diese Verbindung in der Literatur bereits mehrfach beschrieben wurde.^[56, 59] Eine N-terminale Acetylierung und ein C-terminales Carboxamid hat zudem den Vorteil, dass man durch eine Eliminierung der permanenten Ladungen der Einfluss des pH-Wertes der Lösung auf die Schmelztemperatur der Tripelhelix vernachlässigt werden kann.^[25, 191, 209] Daher konnte auf den Einsatz von Puffern verzichtet werden um einen Einfluss durch den Zusatz von Ionen ebenfalls ausschließen zu können.^[210]

Somit können zwei Parameter als kritisch für die Bestimmung der Schmelztemperatur angesehen werden. Zum einen ist dies die Konzentration der Probe und zum anderen die Geschwindigkeit der Temperaturerhöhung der Probe, im weiteren Temperaturrampe genannt.

Zuerst wurde der Einfluss der Temperaturrampe auf die Schmelztemperaturbestimmung via CD-Spektroskopie untersucht. Im Allgemeinen macht man sich für die Bestimmung mittels dieser Methode eine Abnahme des CD-Wertes bei 225 nm, welcher einer tripelhelikalen Spezies zugeordnet werden kann, im Laufe der Temperaturerhöhung zunutze.^[25, 86] Dabei wurde H₂O als Lösungsmittel mit einer Peptidkonzentration von 100 µM gewählt. Messungen wurden mit

Temperaturrampen von 12 °C/h, 24 °C/h, 36 °C/h, 48 °C/h und 60 °C/h durchgeführt und der CD-Wert bei 225 nm in Abhängigkeit der Temperatur gemessen. (Abbildung 10)

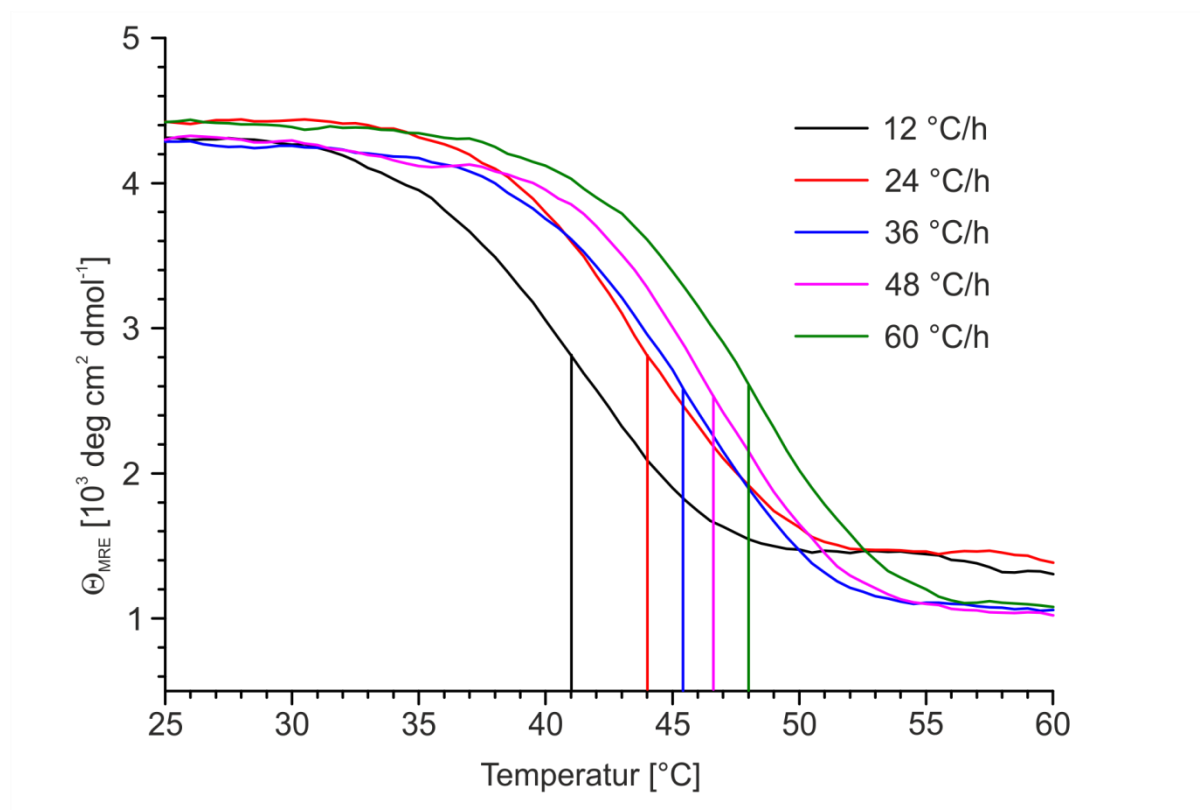


Abbildung 10: Temperaturabhängiger, als MRE normierter, CD-Wert bei 225 nm von 100 µM Ac-(PUG)₇-NH₂ (**8**) in H₂O. Gemessen wurden Temperaturrampen von 12 °C/h (schwarz), 24 °C/h (rot), 36 °C/h (blau), 48 °C/h (violett) und 60 °C/h (grün). Je steiler die Temperaturrampe gewählt wurde, desto höher fiel auch die gemessene Schmelztemperatur, dargestellt durch die senkrechten Linien in entsprechender Farbe, aus.

Deutlich zu erkennen ist eine Verschiebung der Schmelztemperatur hin zu höheren Werten, je steiler die Temperaturrampe gewählt wird. Eine Verdoppelung der Geschwindigkeit des Erhitzens der Probe von 12 °C/h auf 24 °C/h führt dabei zu einer Erhöhung der Schmelztemperatur von etwa 3 °C. Eine weitere Verdopplung auf 48 °C/h führt zu einer weiteren Erhöhung von fast 3 °C. Dieses Verhalten lässt sich insoweit Erklären, als dass das Aufschmelzen der Tripelhelix das Gleichgewicht zwischen tripelhelikaler Spezies und Einzelstrang bei steigender Temperatur immer weiter in Richtung Einzelstrang verschiebt. Nicht zu vernachlässigen ist dabei aber auch, dass zwischen Faltung und Entfaltung eine Hysterese zu beobachten ist. Dabei läuft die Entfaltung schneller ab als die Faltung. Diese Hysterese kann so groß werden, gerade wenn man die Konzentration zu klein wählt, dass man eine Entfaltung außerhalb eines Gleichgewichtszustands beobachtet. Diese Hysterese ist

neben der Konzentration auch abhängig vom Kollagen-Modellpeptid, jedoch weisen Peptide mit PUG-Repetiereinheit eine besonders schnelle Kinetik auf, sodass hier keine Probleme zu erwarten sind.^[98, 211] Wählt man die Temperaturrampe zu steil, so kann sich das Gleichgewicht nicht mehr schnell genug einstellen und man erhält größere CD- und damit schlussendlich höhere T_m -Werte. Eine möglichst flache Temperaturrampe ist somit von großer Bedeutung für das generieren von verlässlichen T_m -Werten.

Neben der Wahl der Temperaturrampe ist auch die Konzentration der Probe von nicht zu vernachlässigender Bedeutung für das Messen von Schmelztemperaturen. Hierbei sind vor allem Bestimmungen mittels CD-Spektroskopie stark begrenzt. Bei Konzentrationen unter 100 μM kann das Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu einer starken Beeinflussung der Messwerte führen, während eine Konzentration von über 500 μM eine zu hohen Absorption, was zu Problemen bei der Detektion mittels *photomultiplier* führt. Durch das Erreichen der Maximalspannung (hier 1 kV) kann kein verlässliches Signal mehr detektiert werden. Allerdings können oberhalb einer Konzentration von 500 μM NMR-spektroskopische Methoden zur Schmelzpunktbestimmung verwendet werden, welche eine im Vergleich zur CD-Spektroskopie von Kollagen-Modellpeptiden einen um ein vielfaches größeren Konzentrationsbereich abdeckt. Ähnlich wie bei der Schmelzpunktbestimmung mittels CD-Spektroskopie wird auch bei der NMR-Spektroskopie die Abnahme der tripelhelikalen Spezies beobachtet. Allerdings geschieht die Bestimmung nicht rein qualitativ, sondern es lässt sich der Anteil tripelhelikaler Spezies der in Lösung befindlichen Kollagen-Modellpeptids bestimmen. Dazu wurde sich zunutze gemacht, dass die H_δ -Protonen der Proline in tripelhelikaler Umgebung eine Hochfeldverschiebung erfahren. Dieses Verhalten wurde zwar bereits beschrieben, allerdings nicht zu einer Schmelzpunktbestimmung eingesetzt.^[24, 212, 213] Da sich hier allerdings keine lineare Temperaturrampe realisierbar ist und die Messung der ^1H -NMR-Spektren bei einer exakten Temperatur erfolgen muss, wurde die Temperatur schrittweise erhöht. Eine Erhöhung der Temperatur um 10 K mit anschließender Wartezeit von 15 Minuten vor der Messung, damit sich das Gleichgewicht aus Einzelstrang und tripelhelikaler Spezies einstellen konnte, erwies sich hier als zielführend. Eine stufenweise Erhöhung der Temperatur ist auch bei der Schmelzpunktbestimmung mittels CD-Spektroskopie möglich, liefert aber vergleichbare Ergebnisse wie das Anwenden einer flachen Temperaturrampe.^[59]

Aus dem Integral der H_δ -Protonen des Prolins in tripelhelikaler Umgebung bei 3.2 ppm im Verhältnis zum Integral der aliphatischen Protonen zwischen 1.5 und 2.5 ppm lässt sich der Anteil der tripelhelikalen Spezies berechnen. Trägt man diesen nun gegen die Temperatur auf, so erhält man einen Graphen, aus dem man nach einer sigmoidalen Regression eine Schmelztemperatur ableiten kann (Abbildung 11). Diese beträgt in diesem Fall für eine Konzentration von 3 mM $T_m = 44,6^\circ\text{C}$.

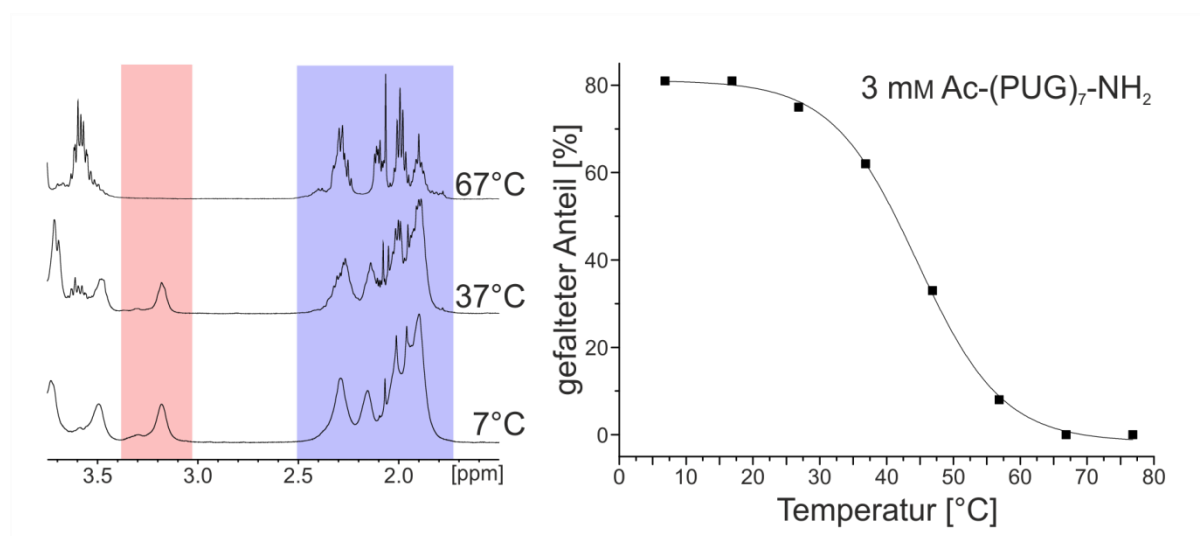


Abbildung 11: Schmelzpunktbestimmung mittels temperaturabhängiger ^1H -NMR-Spektroskopie. **Links:** Einzelne ^1H -NMR-Spektren (500 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1) von $\text{Ac}-(\text{PUG})_7\text{-NH}_2$ (**8**) bei verschiedenen Temperaturen. Deutlich zu erkennen ist die Abnahme der Intensität der H_δ -Protonen der Proline in tripelhelikaler Umgebung (rot unterlegt) im Vergleich zur der Gesamtheit der aliphatischen Protonen aller Spezies (blau unterlegt). Aus dem Verhältnis beider Integrale lässt sich der Anteil der tripelhelikalen Spezies berechnen. **Rechts:** Anteil der gefalteten, also tripelhelikalen Spezies, berechnet aus den ^1H -NMR-Spektren bei entsprechender Temperatur aufgetragen gegen ebendiese. Nach sigmoidaler Regression ließ sich eine Schmelztemperatur von $44,6^\circ\text{C}$ ermitteln.

Die Schmelzpunktbestimmung mittels ^1H -NMR-Spektroskopie hat dabei eine ganze Reihe von Vorteilen. Wie schon bereits erwähnt wird ein viel breiteres Konzentrationsfenster hin zu höheren Konzentrationen abgedeckt. Außerdem lässt sich im Vergleich zur CD Spektroskopie, bei welcher sich keine Aussage über den Anteil der tripelhelikalen Spezies treffen lässt, direkt der Anteil an gefalteter Spezies bestimmen. Dieser liegt für die Referenzverbindung **8** bei etwa 80%. In CD-spektroskopischen Methoden hingegen wird für den CD-Wert bei der niedrigsten Temperatur ein gefalteter Anteil von 100% festgelegt.^[26, 59, 85, 189, 214] Außerdem verläuft ab einer Konzentration von 1 mM die Faltung schnell genug, sodass nach 15 Minuten Wartezeit vor jeder Messung davon ausgegangen werden kann, dass sich das Gleichgewicht eingestellt hat.^[98]

Vergleicht man nun die mittels NMR- bzw. CD-Spektroskopie bestimmten Schmelztemperaturwerte, fällt neben dem allgemeinen Trend bei höherer Konzentration auch höhere Schmelztemperaturen zu beobachten, auf, dass sich die Werte bei Konzentrationen von 0,5 mM und 1 mM zwischen den Methoden stark unterscheiden (Abbildung 12).

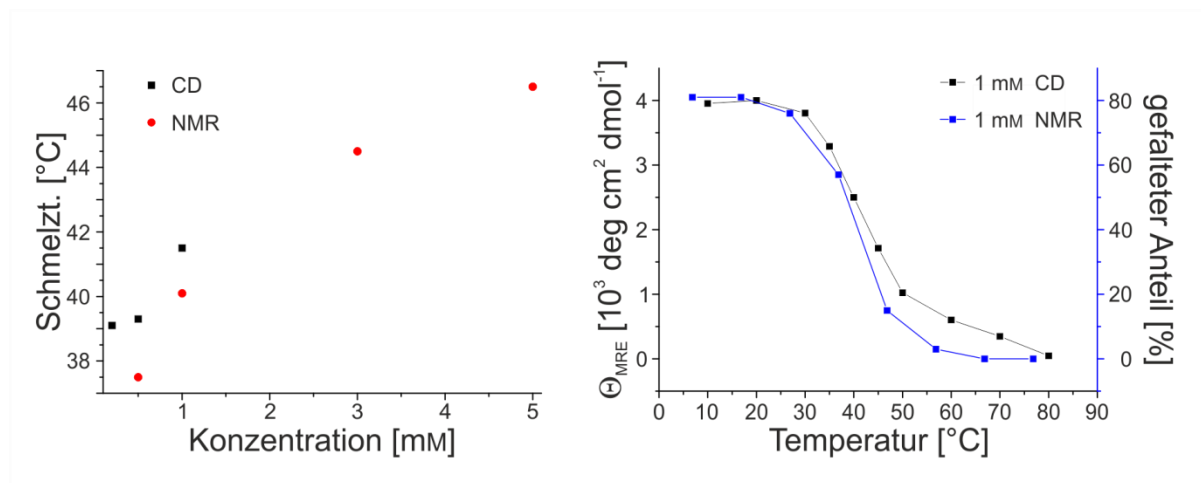


Abbildung 12: Vergleich zwischen Schmelzpunktbestimmung von **8** via CD- und NMR-Spektroskopie. Sowohl für ^1H -NMR-Spektroskopie (500 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1), als auch für CD-spektroskopische Messungen wurde vor Aufnahme der Messung 15 Minuten bei entsprechender Temperatur equilibriert und dann das jeweilige Spektrum aufgenommen um eine Vergleichbarkeit der entsprechenden Methoden zu gewährleisten. **Links:** Vergleich der Schmelztemperatur bei verschiedenen Konzentrationen. CD-spektroskopisch wurden Probenkonzentrationen von 0,2 mM, 0,5 mM und 1 mM untersucht. NMR-spektroskopisch wurden Probenkonzentrationen von 0,5 mM, 1 mM, 3 mM und 5 mM untersucht. **Rechts:** Vergleich der Schmelzkurven einer Probe mit einer Konzentration von 1 mM. Die Bestimmung mittels CD-Spektroskopie lieferte dabei eine höhere Schmelztemperatur was sich in einer Verschiebung der Schmelzkurve in Richtung höherer Temperaturen äußert.

Dabei weicht der Wert für die NMR-spektroskopische Bestimmung des Schmelzpunktes bei einer Probenkonzentration von 0,5 mM gegenüber der CD-spektroskopischen Bestimmung um 1,5 °C nach unten ab, dies ist vor allem damit zu erklären, dass bei einer niedrigen Probenkonzentration zu geringeren Signalintensitäten im ^1H -NMR-Spektrum führt und damit auch zu einem schlechteren Signal-zu-Rausch-Verhältnis. Dies führt zu Fehlern in der Integration der Signale, was in einer abweichenden Schmelztemperatur führt. Bei einer Konzentration von 1 mM ist die Abweichung genau umgekehrt. Dort weicht der mittels CD-Spektroskopie bestimmte Wert 1,5 °C gegenüber dem mittels NMR-Spektroskopie bestimmten Wert nach oben ab. Dies lässt sich damit erklären, dass bei dieser Konzentration bereits niedermolekulare Aggregate vorliegen, welche sich CD-spektroskopisch noch beobachten lassen, mittels NMR-Spektroskopie allerdings nicht mehr, was den mittels CD-Spektroskopie ermittelten Schmelzpunkt nach oben abweichen lässt.^[215] Die CD-spektroskopische Schmelzpunktbestimmung von

Kollagen-Modellpeptiden oberhalb von 0,5 mM ist daher äußerst selten, obwohl die CD-Spektroskopie die dominierende Methode hierfür ist.^[98]

Aufgrund dieser Beobachtungen wurde die NMR-Spektroskopie zur weiteren Bestimmung von Schmelzpunkten eingesetzt. Als geeignete Konzentration wurde dazu 3 mM gewählt.

3.1.3. Synthese eines Dihydroxyprolin-Derivats für die SPPS

Für die Darstellung von Dihydroxyprolin sind bereits diverse Syntheserouten Literaturbekannt. Dieses lassen sich, bezogen auf die beiden Hydroxyfunktionen, in zwei unterschiedliche Synthesestrategien unterteilen. Zum einen in die *chiral pool* Synthesen, bei denen die beiden Hydroxyfunktionen nicht aufgebaut werden, sondern bereits in einem chiralen Ausgangsstoff, beispielsweise einem Zucker-Derivat, in gewünschter Konfiguration vorhanden sind.^[216–218] Zum anderen Synthesestrategien, bei denen beide Hydroxyfunktionen, zumeist durch Dihydroxylierung, in gewünschter Konfiguration erst spät aufgebaut werden, wobei vor allem die Enantio- bzw. Diastereoselektivität ein Problem darstellen.^[5, 219–223] Vier verschiedene Darstellungen von Dihydroxyprolin sind in Abbildung 13 gezeigt.

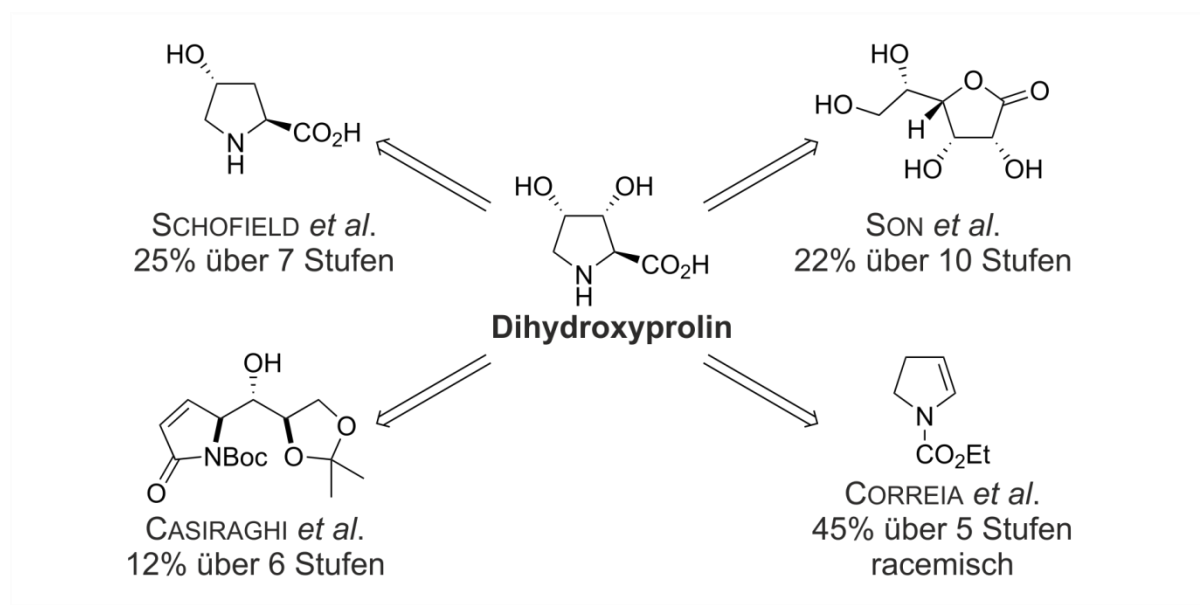
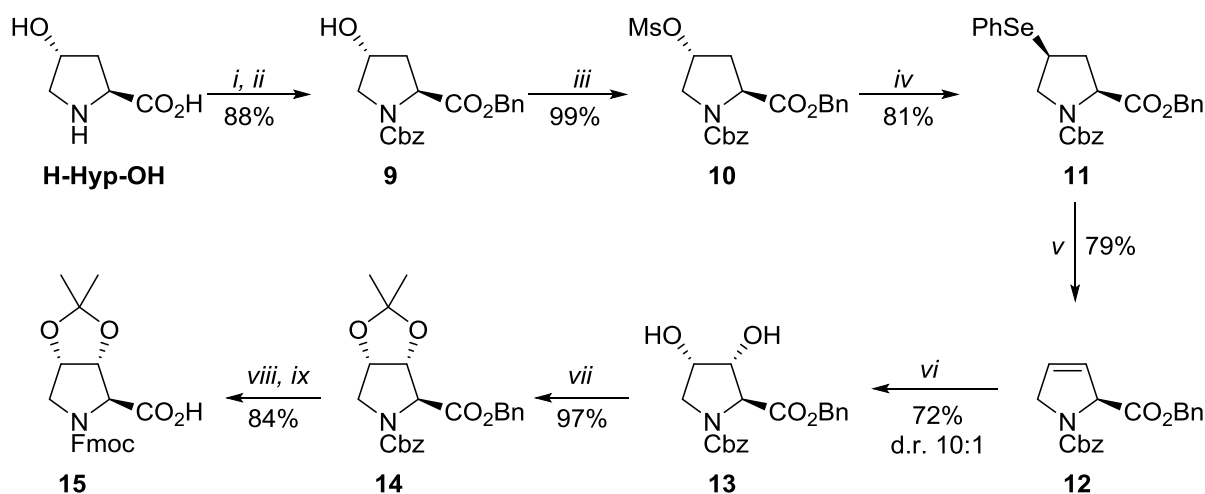


Abbildung 13: Verschiedene Wege der Dihydroxyprolin-Synthese. Zur besseren Übersicht sind die Atome aus den Edukten, welche auch im Dihydroxyprolin vorhanden sind mit rot hervorgehoben. **Oben links:** Darstellung ausgehen von Hydroxyproline von SCHOFIELD *et al.* liefert 25% Ausbeute über 7 Stufen mit einer regioselektiven Eliminierung mit anschließender diastereoselektiven Dihydroxylierung als Schlüsselschritt.^[5] **Oben rechts:** Darstellung ausgehend von D-Gulonolacton von SON *et al.* mit 22% Ausbeute über 10 Stufen als Beispiel einer *chiral pool* Strategie.^[216] **Unten links:** Darstellung von CASIRAGHI *et al.* mit 12% Ausbeute über 6 Stufen mit diastereoselektiver Dihydroxylierung als Schlüsselschritt.^[219] **Unten rechts:** Racemische Synthese von CORREIA *et al.* mit 45% Ausbeute über 5 Stufen. Auch hier ist eine diastereoselektive Dihydroxylierung der Schlüsselschritt zum Aufbau der beiden Hydroxyfunktionen.^[223]

Über eine lange Zeit war nur eine Synthese von einem für die SPPS geeigneten Dihydroxyprolin-Derivat (**15**) von TAYLOR *et al.* Literaturbekannt.^[218] Diese beruhte auf der Synthesestrategie von SON *et al.*, was eine Synthese im Multigrammaßstab durch die moderate Ausbeute über viele Stufen unwirtschaftlich erscheinen lässt.^[216] HÜHN kombinierte die von SCHOFIELD *et al.* beschriebenen Synthese mit der Schutzgruppenstrategie von SON und TAYLOR um den SPPS kompatiblen Dihydroxyprolin-Baustein **15** im Multigrammaßstab in 33% Ausbeute über 9 Stufen darzustellen (Schema 8).^[5, 216, 218, 222]



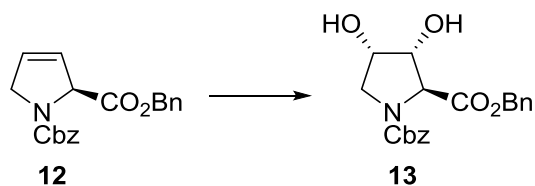
Schema 8: Von HÜHN beschriebene Synthese des SPPS kompatiblen Dihydroxyprolin-Bausteins **15** in 9 Stufen und 33% Gesamtausbeute ausgehend von Hydroxyprolin (**I**)^[5, 222, 224] (i) CbzCl, 1 M NaOH/THF 1:1, 16 h, RT; (ii) BnBr, K₂CO₃, NaI, DMF, 16 h, RT; (iii) MsCl, NEt₃, DMAP, DCM, 2 h, RT; (iv) Ph₂Se₂, NaBH₄, *tert*-BuOH, 3 h, 80 °C; (v) H₂O₂, Pyridin, DCM, 5 h, RT; (vi) K₂OsO₄·2H₂O, NMO, *tert*-BuOH/H₂O 7:3, 21 h, RT; (vii) PTSA, 2,2-Dimethoxypropan, 4 h, RT; (viii) H₂ (10 bar), Pd/C, EtOAc, RT; (ix) FmocCl, 10% Na₂CO₃aq/1,4-Dioxan 1:1, 16 h, RT.

Schlüsselschritt dieser Synthese ist wie schon bei SCHOFIELD *et al.* eine regioselektive Eliminierung, gefolgt von einer substratkontrollierten, diastereoselektiven Dihydroxylierung mit Osmiumtetroxid.^[5, 222, 224] Dabei stellt die Dihydroxylierung den limitierenden Schritt der Synthese dar. Zum einen durch die moderate Ausbeute von lediglich 72% bei nicht vollständigem Umsatz, zum anderen durch den d.r. von 10:1 was ein chromatographisches Abtrennen des anderen Diastereomers notwendig macht, was sich mitunter als aufwendig erwies. Daher wurde einer Optimierung der Dihydroxylierung das größte Potential zur Verbesserung der Synthese eingeräumt. Zum Steigern des Diastereomerenverhältnisses bieten sich chirale Liganden an. Das Benutzen von AD-Mix β zur asymmetrischen Dihydroxylierung nach SHARPLESS, also dem

Liganden (DHDQ)₂Phal, hat sich dabei bereits an sehr ähnlichen Substraten bewährt.^[225–230] Dabei ließ sich das Diastereomerenverhältnis zwar durch Zusatz des Liganden (DHDQ)₂Phal auf 19:1 erhöhen, allerdings wurde die Reaktion, auch trotz einem Erhöhen der Katalysatorbeladung von 2 mol% auf 3 mol%, signifikant verlangsamt und erreichte erst nach 96 Stunden vollständigen Umsatz. Die Ausbeute lag mit 73% auf Ausgangsniveau. Ein weiterer vielversprechender Ansatz war der Zusatz von Citronensäure, da bereits beschrieben ist, dass dessen Zusatz die Reaktion signifikant beschleunigt, weil er zum einen entstehendes NMO protoniert und somit den pH wert, welcher im Verlauf der Dihydroxylierung ansteigt, konstant im optimalen Bereich hält und zum anderen wird die Bildung einer katalytische inaktiven Osmiumspezies verhindert.^[231, 232] Für die Umsetzung des Dehydroprolin-Derivats **12** zu **13** konnte durch Zusatz von 75 mol% Citronensäure die Reaktionszeit deutlich von 16 h auf 1,5 h verkürzt werden. Eine Erhöhung der Menge NMO als Cooxidationsmittel um 25% auf 1,25 Äquivalente und Aceton/H₂O (6:1) als Lösungsmittel lieferte mit 75% allerdings nur leicht verbesserte Ausbeuten. Außerdem ließ sich das Diastereomerenverhältnis auf 13:1 leicht erhöhen. Diese erhöhte Diastereoselektivität kann mit einer Komplexierung des Osmiums durch die Citronensäure und dem damit einhergehenden erhöhten sterischen Anspruch des Komplexes erklärt werden. Eine Kombination beider Methoden durch Zusatz (DHDQ)₂Phal und Citronensäure ist allerdings nicht möglich, da selbst der Zusatz kleinster Mengen Citronensäure die Stereoinduktion des chiralen Liganden vollkommen unterdrückt.^[232] Aus diesen Gründen stellt der Zusatz von Citronensäure, welcher zwar nicht das beste Diastereomerenverhältnis im Vergleich zum (DHDQ)₂Phal-Zusatz liefert, durch die drastisch reduzierte Reaktionszeit allerdings die vielversprechendste Optimierung der Dihydroxylierung von Dehydroprolin-Derivaten, was gerade im Hinblick auf die Umsetzung von deutlich komplexeren Dehydroprolin-Derivaten von enormer Wichtigkeit ist, dar. Die Reaktionsbedingungen von HÜHN, sowie die Umsetzungen unter Zusatz von (DHDQ)₂Phal sowie Citronensäure welche die besten Ausbeuten lieferten sind in Tabelle 8 zusammengefasst.^[222, 224]

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 8: Bedingungen für die osmiumkatalysierte Dihydroxylierung von Dehydroprolin-Derivat **12** zum Dihydroxyprolin-Derivat **13**.



Eintrag	Lösungsmittel	Reagenzien	Reaktionszeit	Ausbeute
1 ^[222]	<i>tert</i> -BuOH/H ₂ O	1,00 Äq. NMO	16 h	71%
	7:3	2 mol% K ₂ OsO ₄ •2H ₂ O		d.r. 10:1 ^a
2	<i>tert</i> -BuOH/H ₂ O	1,00 Äq. NMO	96 h	73%
	7:3	3 mol% K ₂ OsO ₄ •2H ₂ O		d.r. 19:1 ^a
		7,5 mol% (DHDQ) ₂ Phal		
3	Aceton/H ₂ O	1.35 Äq. NMO	1,5 h	75%
	6:1	3 mol% K ₂ OsO ₄ •2H ₂ O		d.r. 13:1 ^a
		75 mol% Citronensäure		

^aBestimmt aus dem ¹H-NMR-Spektrum des Rohprodukts.

Im Rahmen dieser Arbeit ist es außerdem zum ersten Mal gelungen eine Molekülstruktur im Festkörper des Mesylats **10** zu erhalten, welche von MARSCH gelöst und mit der von HÜHN durchgeführten Konformationsanalyse in Lösung verglichen werden konnte.^[222] Das Mesylat **10** bildete im Festkörper ein monoklines Kristallsystem der Raumgruppe P2₁ mit zwei Formeleinheiten pro Elementarzelle. Beide Formeleinheiten unterscheiden sich konformationell aber nicht voneinander (Abbildung 14).

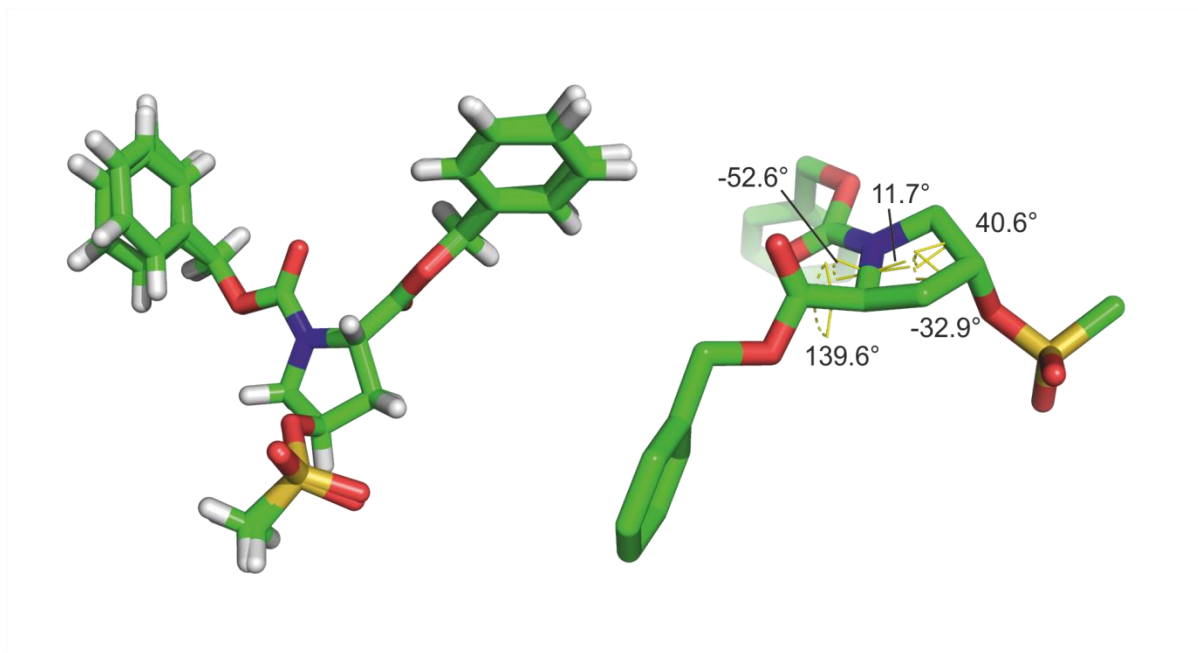


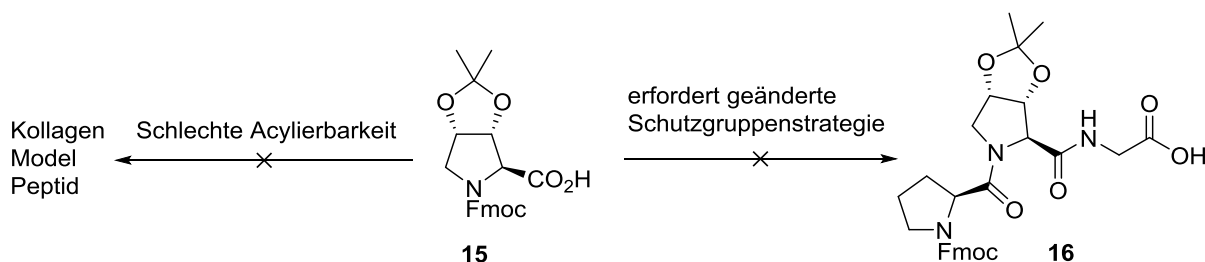
Abbildung 14: Molekülstruktur im Festkörper des Mesylats **10**. Wasserstoffatome sind in weiß, Kohlenstoffatome in grün, Sauerstoffatome in rot, Stickstoffatome in blau und Schwefelatome in gelb dargestellt. **Links:** Das Übereinanderlegen beider Formeleinheiten zeigt, bis auf minimale Rotation der Phenylringe, keinen konformationellen Unterschied zwischen ebendiesen. **Rechts:** Eine Formeleinheit mit den Diederwinkeln $\Phi = -52.6^\circ$, $\Psi = 139.6^\circ$, $X^0 = 11.7^\circ$, $X^2 = -32.9^\circ$ und $X^3 = 40.6^\circ$. Deutlich zu sehen ist die *trans*-Konfiguration des Carbamats und das *C γ -exo* *puckering* des Pyrrolidinrings. Zur besseren Übersicht sind die Wasserstoffatome nicht gezeigt

Die Carbamatschutzgruppe weist dabei eine *trans*-Konfiguration mit einem Diederwinkel von $\omega = -179,6^\circ$ auf und ist damit planar. Der Diederwinkel um die N- C_α -Bindung liegt bei $\Phi = -52,6^\circ$, der um die C_α -C=O-Bindung bei $\Psi = 139,6^\circ$. Diese liegen in einem für Prolin-Derivate üblichem Bereich, besitzen aber eine eingeschränkte Aussagekraft, da hier lediglich eine isolierte Aminosäure betrachtet wird.^[233] Deutliche mehr Aussagekraft hat dabei die Betrachtung der Geometrie des Pyrrolidinrings, also der X-Winkel über die sich auch das *puckering* der Rings beschreiben lässt. Dabei sind vor allem die X-Winkel um das C_γ , also X^2 und X^3 besonders hervorzuheben, da hiermit das *puckering* exakt ermittelt werden kann.^[234, 235] Mit $X^2 = 40,6^\circ$ und $X^3 = -32,9^\circ$ lässt sich für **10** eindeutig ein *C γ -exo* *puckering* ableiten. Dies ist in Übereinstimmung mit der Konformationsanalyse in Lösung.^[222] Ein weiterer interessanter Parameter ist der X^0 (Teilweise auch als X^5 beschrieben). Er beschreibt den Diederwinkel von C_δ -N- C_α - C_β um die N- C_α -Achse. Mit einem Wert von $X^0 = 11,7^\circ$ ist die Torsion ungewöhnlich groß, sodass man in diesem Fall bereits von einer *twisted-envelope*-Konformation sprechen kann.^[234, 236] Neben dem Vergleich mit einer Struktur in Lösung ist außerdem ein Vergleich mit anderen Molekülstrukturen im Festkörper naheliegend. Allerdings ist bisher nur ein

weiteres, strukturell sehr ähnliches, Derivat von WILLMS *et al.* beschrieben.^[237] Dieses Boc- und *tert*-Butylester-geschützte Mesylat, ein Derivat welches sich also nur in seiner N- und C-terminalen Schutzgruppe von **10** unterscheidet, kristallisiert in einer orthorombischen Raumgruppe mit einer Formeleinheit pro Elementarzelle mit der Raumgruppe P2₁2₁2₁. Ein weiterer entscheidender Unterschied ist auch die *cis*-Konfiguration der Carbamatschutzgruppe mit einem Diederwinkel von $\omega = -5,0^\circ$. Der Φ -Winkel liegt mit $-55,1^\circ$ in einem ähnlichen Bereich, was durch die eingeschränkte Beweglichkeit des Pyrrolidinrings allerdings üblich ist.^[233] Stark abweichend ist hingegen der Ψ -Winkel mit $-21,9^\circ$. Die X^2 - und X^3 -Winkel sind mit $39,3^\circ$ und $-35,7^\circ$, welche ebenfalls ein *C γ -exo puckering* beschreiben, nahezu identisch zu denen des Mesylats **10**. Die Torsion um die N-C $_{\alpha}$ -Achse ist mit $X^0 = 4,7^\circ$ auch deutlich geringer.

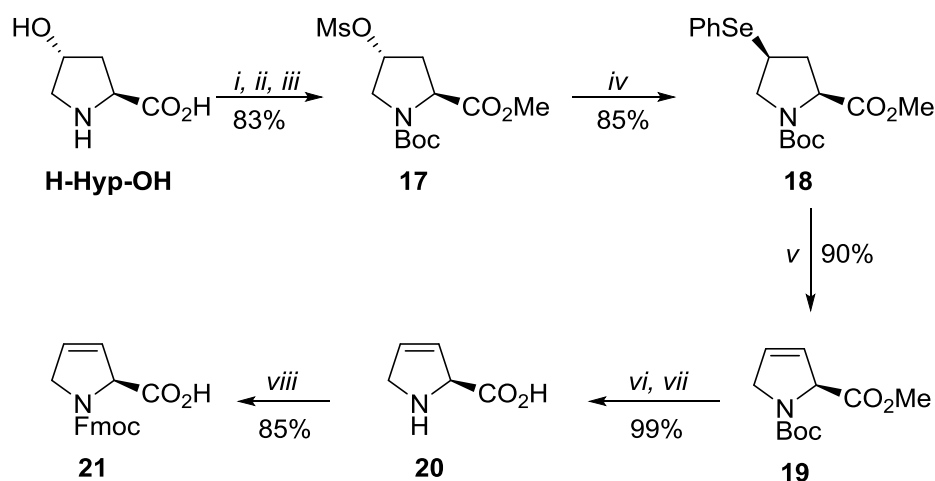
3.1.4. Synthese eines geeigneten Vorläufer für die *late-stage* Dihydroxylierung

Wie schon in Kapitel 3.1.1. beschrieben ist die Acylierung von Hydroxyprolin nicht trivial.^[63, 196–198] Dihydroxyprolin ist hingegen noch einmal deutlich schlechter acylierbar, was zu Reaktionszeiten bis zu 2 Wochen führen kann.^[188, 224] Aus diesem Grund wurde als nicht zielführend erachtet, für die Synthese von Kollagen-Modellpeptiden auf den Dihydroxyprolin-Baustein **15** zurückzugreifen, da geringe Ausbeuten und Probleme bei der Reinigung durch die Vielzahl an möglichen Deletionsmutanten zu erwarten waren. Die Darstellung eines Tripeptid-Bausteins ist ausgehend von der in Kapitel 3.1.2. beschriebenen Synthese im Multigrammmaßstab kaum in guten Ausbeuten, durch das zuvor erwähnte Problem der Acylierung, zu realisieren und erfordert eine geänderte Schutzgruppenstrategie. Somit ist der Baustein **15** zwar für die Synthese von kleinen und mittleren Peptidsequenzen geeignet, nicht jedoch für die Synthese von Kollagen-Modellpeptiden (Schema 9).^[197, 224, 238, 239]



Schema 9: Die schlechte Acylierbarkeit lässt eine Anwendung von Baustein **15** in der Synthese von Kollagen-Modellpeptiden als problematisch erscheinen. Eine Synthese des dihydroxyprolinhaltigen Tripeptid-Bausteins **16** erfordert eine geänderte Schutzgruppenstrategie und löst nicht das Problem der schlechten Acylierbarkeit sondern verschiebt es lediglich auf die Tripeptidsynthese.

Der vielversprechendste Lösungsansatz, um zu Dihydroxyprolin-haltigen Kollagen-Modellpeptiden zu gelangen war, nicht einen Dihydroxyprolin-Baustein in der SPPS einzusetzen, sondern einen geeigneten Vorläufer, welcher sich nach Aufbau der gewünschten Peptidsequenz in Dihydroxyprolin überführen ließ. Dabei erschien Dehydroprolin-Baustein das geeignete Synthon zu sein, da es zwei Probleme auf einmal löst. Zum einen ist keine Seitenkettenschutzgruppe für das Olefin notwendig, was einige Synthesestufen einspart. Zum anderen sind bei Dehydroprolin-Bausteinen, im Vergleich zu Dihydroxyprolin-Baustein **15**, keine Probleme in der SPPS Literaturbekannt.^[240] Allerdings kann eine Dihydroxylierung auf der Stufe des assemblierten Peptids, also eine *late-stage* Dihydroxylierung, potentiell zu Problemen bei der Diastereoselektivität führen. Ausgehend von Hydroxyprolin konnte dabei in einer 8 stufigen Synthese der SPPS kompatible Dehydroprolin-Baustein **21** in 53% Gesamtausbeute dargestellt werden (Schema 10).^[220, 241–243]

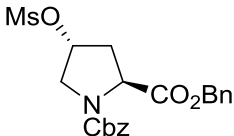
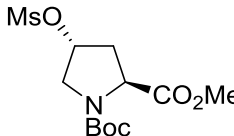
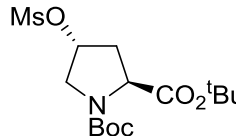


Schema 10: Synthese des SPPS-kompatiblen Dehydroprolin-Bausteins **21** ausgehend von Hydroxyprolin (**I**) in 53% Ausbeute über 8 Stufen (i) SOCl_2 , MeOH_{abs} , 19 h, RT; (ii) Boc_2O , DMAP, NEt_3 , DCM, 19 h, RT; (iii) MsCl , NEt_3 , DMAP, DCM, 5 h, RT; (iv) Ph_2Se_2 , NaBH_4 , *tert*-BuOH, 3 h, 80 °C; (v) H_2O_2 , Pyridin, DCM, 3 h, RT; (vi) LiOH , THF/ H_2O 1:1, 2 h, RT; (vii) DCM/TFA 5:1, 2 h, RT; (viii) FmocCl, 10%ige Na_2CO_3 aq/1,4-Dioxan 1:1, 1 h, RT.

Es gelang außerdem darüber hinaus eine Molekülstruktur im Festkörper des Mesylats **17** zu erhalten, welche durch MARSCH gelöst werden konnte. **17** bildet dabei ein orthorombisches Kristallsystem der Raumgruppe $P2_12_12_1$ mit einer Formeleinheit pro Elementarzelle. Allein an diesen Parametern ließ sich bereits erkennen, dass ein Vergleich mit dem strukturell extrem ähnlichen, sich nur in der C-terminalen Schutzgruppe unterscheidendem Mesylat von WILLMS *et al.* naheliegend ist.^[237] Dies wurde auch noch einmal durch die *cis*-Konfiguration der Carbamatschutzgruppe unterstrichen. Diese Beobachtung legte den Schluss nahe, dass die Schutzgruppe beim Ausbilden des *cis*- oder *trans*-konfigurierten Carbamats des Moleküls im Festkörper eine entscheidende Rolle einnimmt. Dies war insoweit erstaunlich, da in Lösung sowohl das Cbz-geschützte Mesylat **10**, als auch das Boc-geschützte Derivat **17** eine *cis/trans*-Verhältnis von etwa 40:60 aufweisen. Für die Vermutung, dass eine Boc-Schutzgruppe am Pyrrolidinring im Festkörper bevorzugt eine *cis*-Konfiguration, eine Cbz-Schutzgruppe hingegen eine *trans*-Konfiguration einnimmt, lassen sich in der Literatur zwar Beispiele von vergleichbaren Verbindungen finden, allerdings ist die Anzahl zu gering um von einen generellen Trend sprechen zu können.^[75, 236, 244, 245] Für die charakteristischen Diederwinkel ließen sich $\Phi = -71,0^\circ$ und $\Psi = 163,8^\circ$ ermitteln. Für die X-Winkel ergaben sich Werte von $X^0 = 4,8^\circ$, $X^2 = 36,5^\circ$ und $X^3 = -33,1^\circ$, welche ein *C γ -exo puckering* beschreiben. Somit lässt sich sagen, dass die N- und C-terminalen Schutzgruppen einen signifikanten Einfluss auf die Molekülstruktur im Festkörper haben. Sie beeinflussen maßgeblich Kristallsystem, Raumgruppe sowie Φ - und Ψ -Winkel sowie ω -Winkel, welcher in direkter Verbindung mit der *trans*- oder *cis*-Konfiguration des Carbamats steht. Die X^2 - und X^3 -Winkel sind hingegen lediglich von Substituenten am Pyrrolidinring abhängig und liegen hier, da in allen Verbindungen das Substitutionsmuster am Pyrrolidinring identisch ist, in einen sehr ähnlichen Bereich, was zu einem *C γ -exo puckering* in allen Verbindungen führt. Alle Werte der verschiedenen Mesylate sind noch einmal in Tabelle 9 zusammengefasst.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 9: Kristallsystem, Raumgruppe und ausgewählte Diederwinkel für die Mesylate **10**, **17** und dem von WILLMS *et al.* beschriebenen Derivat, welche sich nur in den N- und C-terminalen Schutzgruppen unterscheiden.^[237]

			
Verbindung	10	17	WILLMS <i>et al.</i> ^[237]
Kristallsystem	monoklin	orthorombisch	orthorombisch
Raumgruppe	P2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
ω	-179,6° (<i>trans</i>)	4,1° (<i>cis</i>)	-5,0° (<i>cis</i>)
Φ	-52,6°	-71,0°	-55,1°
Ψ	139,6°	163,8°	-21,9°
X^0	11,7°	4,8°	4,7°
X^2	40,6°	36,5°	39,3°
X^3	-32,9°	-33,1°	-35,7°

Neben dem Mesylat **17** war es auch möglich eine Molekülstruktur im Festkörper des Selen-Derivats **18** zu erhalten, welche ebenfalls durch MARSCH gelöst werden konnte. **18** bildet ein monoklines Kristallsystem der Raumgruppe P2₁ mit einer Formeleinheit pro Elementarzelle. Die Carbamatschutzgruppe weist dabei eine *cis*-Konfiguration auf dessen ω -Winkel mit -21,8° ungewöhnlich hoch ausfällt. Φ - sowie Ψ -Winkel liegen mit -57,0° bzw. 172,8° in einen gewöhnlichen Bereich. Der C-Se-C-Bindungswinkel liegt bei 99,5° und liegt damit in einem Bereich, welcher auch in der Literatur für das C-Se-Ph-Strukturmotiv berichtet wird.^[246, 247] Deutlich interessanter ist hingegen eine Betrachtung des Pyrrolidinrings. Hier ergibt sich für den Torsionswinkel um die C _{α} -C _{β} -Bindung ein Wert von $X^1 = 1.2^\circ$. Das bedeutet, dass in der *envelope*-Konformation eine Ebene durch N, C _{α} , C _{β} und C _{γ} aufgespannt wird, was nur ein *puckering* des C _{δ} zulässt. Mit $X^3 = -31,8^\circ$ und $X^4 = 34,6^\circ$ ließ sich das *puckering* eindeutig als C _{δ} -*endo* bestimmen (Abbildung 15).

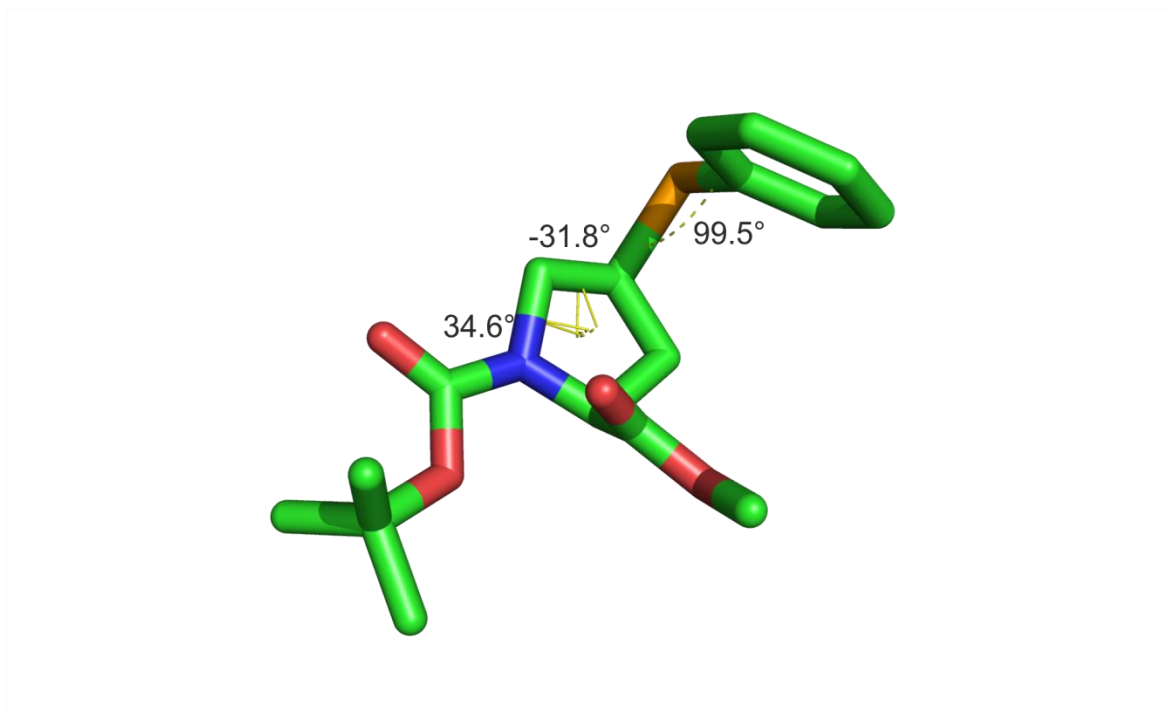


Abbildung 15: Molekülstruktur im Festkörper der Selenverbindung **18**. Kohlenstoffatome sind in grün, Sauerstoffatome in rot, Stickstoffatome in blau und Selenatome in gelb dargestellt. Auf die Darstellung der Wasserstoffatome wurde der Übersichtlichkeit halber verzichtet. Eingezeichnet sind der C-Se-Ph-Winkel mit $99,5^\circ$, der X^3 -Winkel mit $-31,8^\circ$ und der X^4 -Winkel mit $34,6^\circ$.

Erstaunlich ist dabei, dass es sich um ein *puckering* eines unsubstituierten Ringkohlenstoffs eines substituierten Prolinrings handelt. Substituierte Proline sind dafür bekannt, dass ein *puckering* am substituierten Kohlenstoffatom auftritt.^[61, 248–255] Da allerdings die Konformation der meisten Prolin-Derivate in Lösung durchgeführt wurden und eher wenige vergleichbare Molekülstrukturen im Festkörper bekannt sind, ist eine Konformationsanalyse in Lösung nötig um die Frage zu beantworten, ob dieses extrem ungewöhnliche *puckering* auch in Lösung auftritt oder nur im Festkörper zu beobachten ist. Im Festkörper ergeben sich für die Diederwinkel zwischen H_α und H_β Werte von 0° bzw 120° . Die lässt nach der Karplus-Beziehung eine große und eine mittlere 3J -Kopplungskonstante erwarten. Aus dem 1H -NMR-Spektrum von **18** ließen sich allerdings zwei Kopplungskonstanten von je $^3J = 7.6$ Hz ermitteln, was eher Diederwinkeln von 30 - 50° und 120 - 140° entsprechen würde. Der ROE-Kontakte zwischen H_β^{proS} und H_δ^{proS} sowie H_α und H_γ legen ebenfalls den Schluss nahe, dass in Lösung nicht die C_δ -*endo*-Konformation eingenommen werden kann, da dort diese Protonen nicht diaxial zueinander stehen, was für die beobachteten ROE-Kontakte Voraussetzung ist. Durch diese Analyse der

NMR-Spektren lässt sich für die Verbindung **18** eine C_γ -exo-Konformation in Lösung ableiten (Abbildung 16). Dies ist Vergleichbar mit ähnlichen Prolin-Derivaten wie beispielsweise Mercaptoprolin, welches in identischer absoluter Konfiguration auch in C_γ -exo-Konformation vorliegt.^[252]

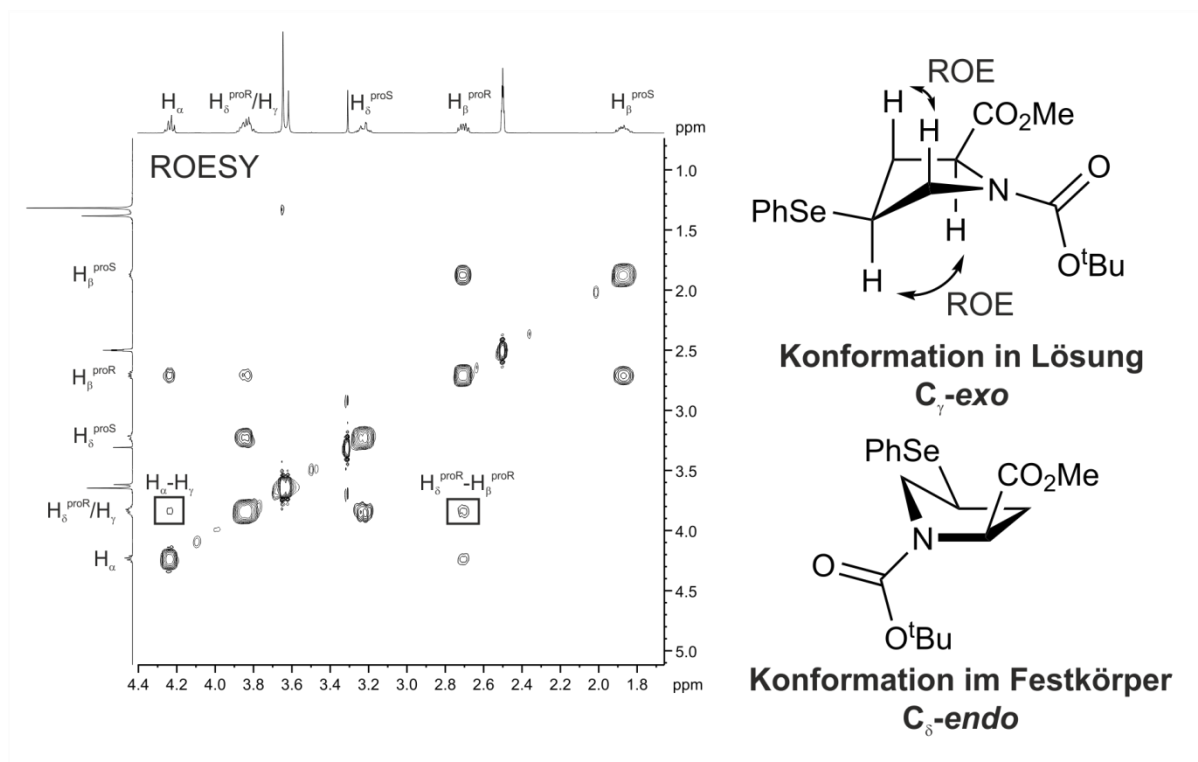
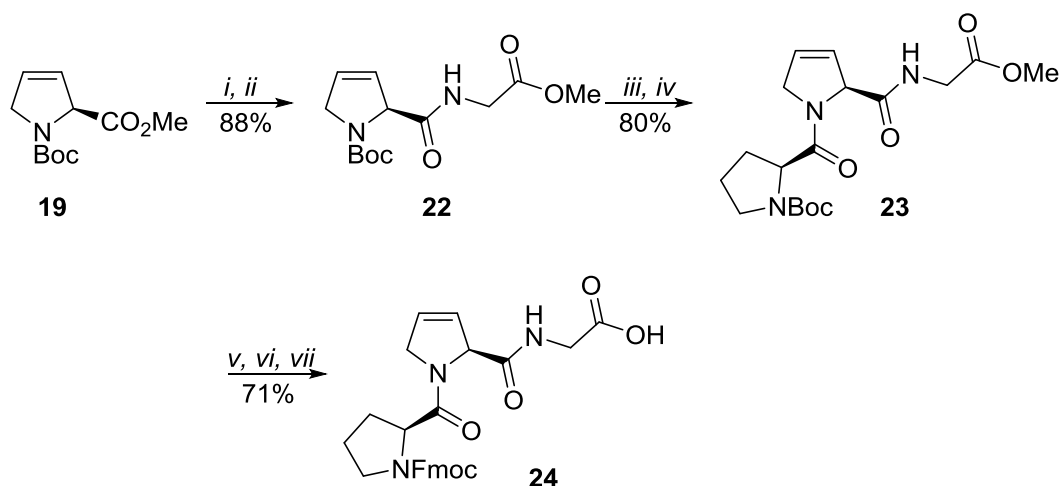


Abbildung 16: Konformationsanalyse des Selen-Derivats **18**. **Links:** Ausschnitt aus dem ROESY-Spektrum der Verbindung **18** (500 MHz, 300 K, DMSO- d_6). Die charakteristischen ROE-Kontakte sind dabei besonders hervorgehoben. **Rechts:** Der Vergleich zwischen C_γ -exo-Konformation in Lösung der im Festkörper beobachteten C_δ -endo Konfiguration.

Da für eine Synthese von Kollagen-Modellpeptiden eine Strategie via Fragmentkondensation verfolgt wurde, wurde neben dem SPPS-Baustein **21**, ausgehen von Boc-Dhp-OMe (**19**) über das Di- und Tripeptid **22** und **23** das Tripeptidfragment Fmoc-Pro-Dhp-Gly-OH (**24**) aufgebaut. Dazu wurde die Sequenz erst C-Terminal um ein Glycin, dann N-Terminal um ein Prolin erweitert, bevor im letzten Schritt die Fmoc-Schutzgruppe eingeführt wurde. Das SPPS-Fragment **24** wurde dabei ausgehen von Boc-Dhp-OMe (**19**) in 50% Ausbeute über 7 Stufen dargestellt (Schema 11).



Schema 11: Synthese des SPPS-kompatiblen Tripeptidfragments **24** ausgehend von Boc-Dhp-OMe (**19**) in 50% Ausbeute über 7 Stufen. (i) LiOH, THF/H₂O 1:1, 2 h, RT; (ii) H-Gly-OMe, HBTU, HOBT, DIPEA, DMF, 2 h, RT; (iii) DCM/TFA 5:1, 2 h, RT; (iv) Boc-Pro-OH, HBTU, HOBT, DIPEA, DMF, 20 h, RT; (v) LiOH, THF/H₂O 1:1, 1,5 h, RT; (vi) DCM/TFA 5:1, 3 h, RT; (vii) FmocCl, 10%ige Na₂CO₃/1,4-Dioxan 1:1, 18 h, RT.

Dabei war es auch möglich von Dipeptid **22** eine Molekülstruktur im Festkörper zu erhalten, welche von MARSCH gelöst werden konnte. **22** bildet dabei ein monoklines Kristallsystem mit der Raumgruppe $P2_1$ und zwei Formeleinheiten pro Elementarzelle. Dabei sind beide Formeleinheiten strukturell deutlich unterschiedlich, was sich in der Konfiguration der Carbamatschutzgruppe zeigt. Für Elementarzelle liegt das Carbamat einer Formeleinheit von **22** in *trans*- und die Andere in *cis*-Konfiguration vor. Für das *trans*-Konformer ergeben sich dabei Diederwinkel von $\omega_{\text{Dhp}} = -174,3^\circ$, $\Phi_{\text{Dhp}} = -82,2^\circ$, $\Psi_{\text{Dhp}} = 172,4^\circ$, $\omega_{\text{Gly}} = -169,4^\circ$, $\Phi_{\text{Gly}} = -68,5^\circ$ und $\Psi_{\text{Gly}} = 171,7^\circ$. Für das *cis*-Konformer hingegen ließen sich Werte von $\omega_{\text{Dhp}} = 4,5^\circ$, $\Phi_{\text{Dhp}} = -68,1^\circ$, $\Psi_{\text{Dhp}} = 130,9^\circ$, $\omega_{\text{Gly}} = -169,6^\circ$, $\Phi_{\text{Gly}} = 52,9^\circ$ und $\Psi_{\text{Gly}} = -141,3^\circ$ ermitteln. Die ω -Winkel liegen dabei in allen Fällen in einem für *cis*- bzw. *trans*-Konformation üblichen Rahmen.^[256] Auch für die Φ - und Ψ -Winkel beider Dhp-Konformere konnten bereits von PARK *et al.* in Modellrechnungen in der Gasphase für ein strukturell eng verwandtes Dipeptid ähnliche Werte erhalten werden.^[257] Weiterhin ist zu erwähnen, dass alle X-Winkel des 3-Pyrrolinrings von *cis*- als *trans*-Konformer nahe null sind, also nahezu planar. Zwar sind auch 3-Pyrrolidinringe mit leichtem *puckering* am Stickstoff, bedingt durch die Doppelbindung, welche die Kohlenstoffe im 3-Pyrrolinring in eine Ebene zwingt, bekannt, allerdings sind Strukturen ohne *puckering* wie hier deutlich bevorzugt.^[30, 257, 258] Außerdem liegen die beiden Formeleinheiten nicht isoliert und in nahezu identischer Konformation vor wie beispielsweise bei der Molekülstruktur im

Festkörper von Mesylat **10**. Vielmehr gibt ein Abstand von etwa 1.9 Å zwischen dem Carbonylsauerstoff des Dehydroprolins und dem Amid-NH des Glycins einen starken Hinweis auf die Ausbildung einer intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den beiden Formeleinheiten, was auch nochmal durch den Winkel von 123,4°, welcher sehr nah am idealen Winkel von 120° liegt, unterstützt. Diese Wasserstoffbrücken lassen sich auch zwischen den einzelnen Elementarzellen beobachten. Dies führt zu einem linearen Netzwerk aus intermolekularen Wasserstoffbrücken. Dabei treten das *cis*- und *trans*-Konformer in diesem linearen Netzwerk alternierend auf. Außerdem ist auch die räumliche Ausrichtung der sterisch anspruchsvollen *tert*-Butylgruppen alternierend (Abbildung 17).

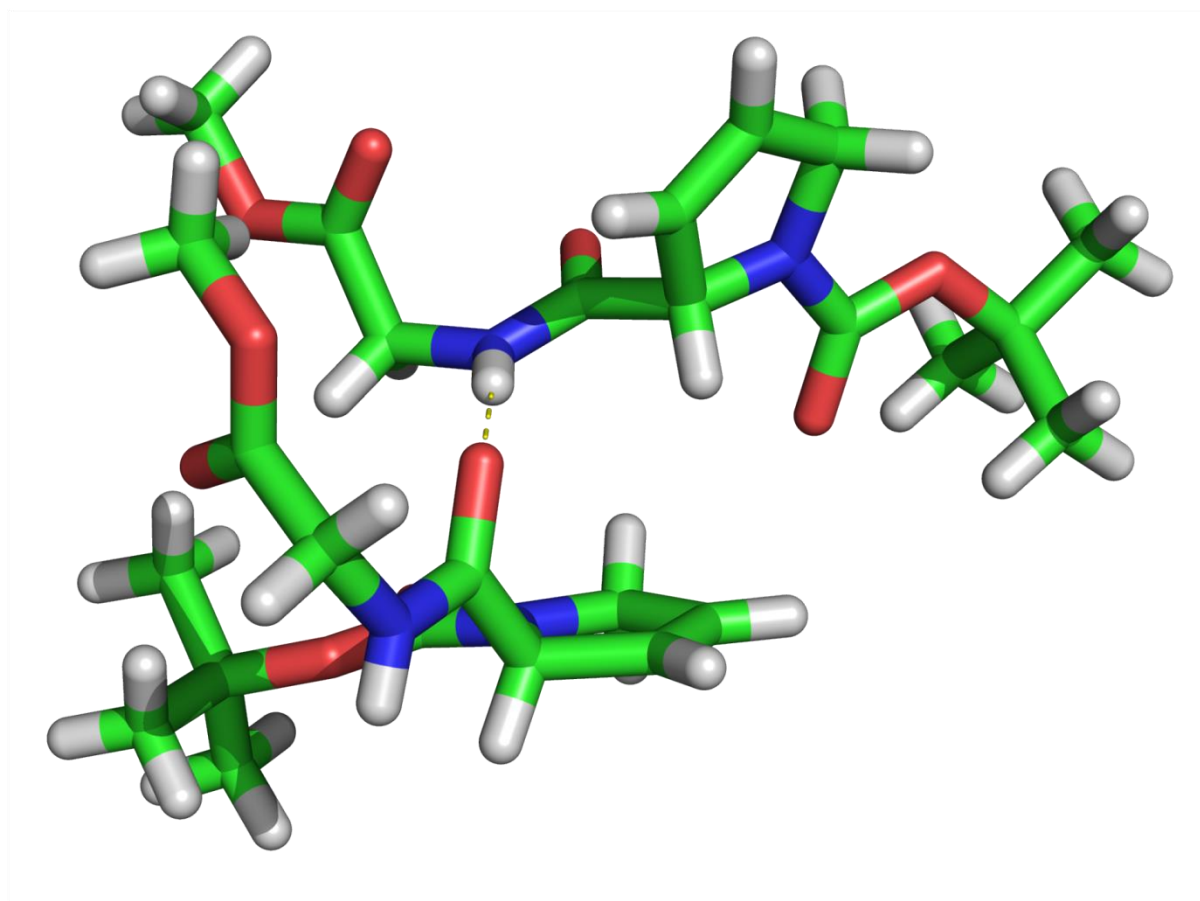
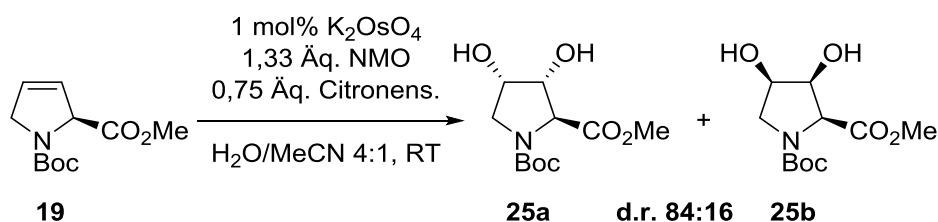


Abbildung 17: Molekülstruktur im Festkörper des Dipeptids **22**. Kohlenstoffatome sind in grün, Sauerstoffatome in rot, Stickstoffatome in blau und Wasserstoffatome in weiß dargestellt. Die Wasserstoffbrücke mit einem Abstand zwischen Carbonylsauerstoff und Amid-NH von 1.9 Å ist mit der gelben, gestrichelten Linie angedeutet. Deutlich zu erkennen das *cis*-konfigurierte Carbamat in der oberen Formeleinheit sowie die *trans*-Konfiguration in der Unteren. Außerdem lässt sich die Planarität des 3-Pyrrolinring in beiden Formeleinheiten erkennen. In dieser Darstellung verläuft das lineare, intermolekulare Wasserstoffbrückennetzwerk von oben nach unten.

3.1.5. Dihydroxylierung von Kollagen-Ausschnitten

Um das Verhalten von komplexen Peptidstrukturen wie Kollagen-Modellpeptiden in der Dihydroxylierung zu untersuchen, wurden zunächst kleine Ausschnitte einer möglichen Sequenz dihydroxyliert. Als Modellsystem eigneten sich besonders der Peptid-Baustein Boc-Dhp-OMe (**19**), das Dipeptid Boc-Dhp-Gly-OMe (**22**) sowie das Tripeptid Boc-Pro-Dhp-Gly-OMe (**23**), welches eine Repetiereinheit darstellt, da alle Verbindungen als Ausschnitt eine Kollagensequenz angesehen werden können und außerdem im Rahmen der Synthese des SPPS-Bausteins **24** als Zwischenprodukte auftreten. Im Hinblick auf die Umsetzung von Peptidstrukturen mit hohem Molekulargewicht, wurden kleine Änderungen an den Reaktionsbedingungen vorgenommen. Anders als in Kapitel 3.1.2. wurde statt Aceton/H₂O (6:1) der Wasseranteil deutlich erhöht, um der guten Löslichkeit von Kollagen-Modellpeptiden in Wasser Rechnung zu tragen. Außerdem wurde als Co-Lösungsmittel Acetonitril verwendet um etwaige Löslichkeitsprobleme durch die unpolaren Schutzgruppen der Modellverbindungen zu verhindern. Das Benutzen eines Lösungsmittelgemisches aus Wasser und Acetonitril bietet zudem die Möglichkeit, die Reaktionslösung direkt mittels semipräparativer RP-HLPC zu reinigen. Da die Löslichkeit von Citronensäure, NMO und Kaliumosmat in Wasser kein Problem darstellt, ist auch eine Umsetzung in reinem Wasser möglich. Somit wurden Kollagen-Ausschnitte **19**, **22** sowie **23** mit 1 mol% K₂OsO₄•2 H₂O, 1,33 Äq. NMO und 0,75 Äq. Citronensäure in H₂O/MeCN (4:1) umgesetzt.

Die Umsetzung von Boc-Dhp-OMe verlief auch unter den geänderten Reaktionsbedingungen Problemlos. Sowohl die Ausbeute mit 92% (Beide Diastereomere) als auch das Diastereomerenverhältnis von 82:18 (*trans:cis*), ermittelt aus dem ¹H-NMR-Spektrum des Rohprodukts, stimmten mit literaturbekannten Umsetzungen überein (Schema 12).^[220]



Schema 12: Dihydroxylierung von Boc-Dhp-OMe (**19**) liefert ein Diastereomerengemisch aus **25a** und **25b** im Verhältnis 82:18 in 92% Gesamtausbeute.

Bei der Durchführung fiel auf, dass sich die Reaktionslösung nach Zugabe von Kaliumosmat intensiv grün färbte. SHARPLESS *et al.* führten die Grünfärbung auf die Präsenz eines Osmium(VI)-bis(glycolat)-Komplexes zurück. Dieser Komplex welcher Teil des postulierten Katalysezyklusses ist, wird mit dem Substrat gebildet. Ist das Substrat vollständig umgesetzt liegt der Katalysator jedoch als Osmium(VIII)-mono(glycolat)-Komplex vor, welcher in Lösung farblos bis blass gelb ist.^[232] Damit steht das Entfärben der Lösung in direktem Zusammenhang mit dem vollständigen Substratumsatz (Abbildung 18).

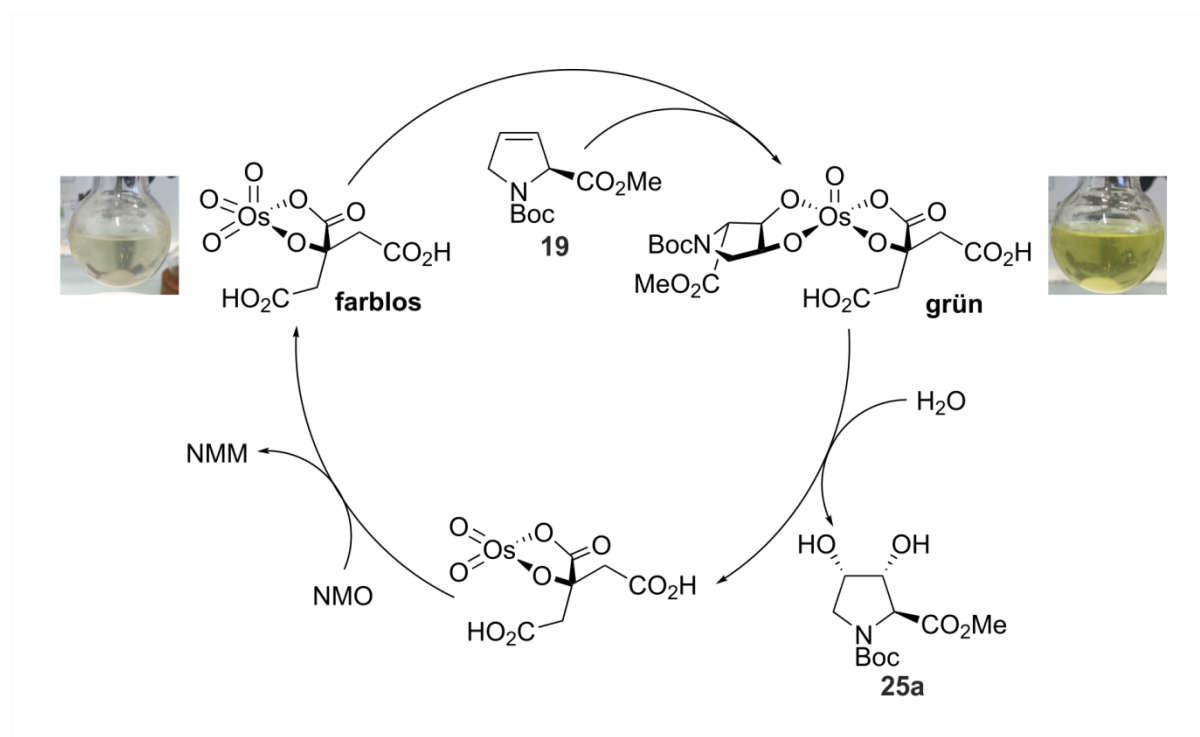
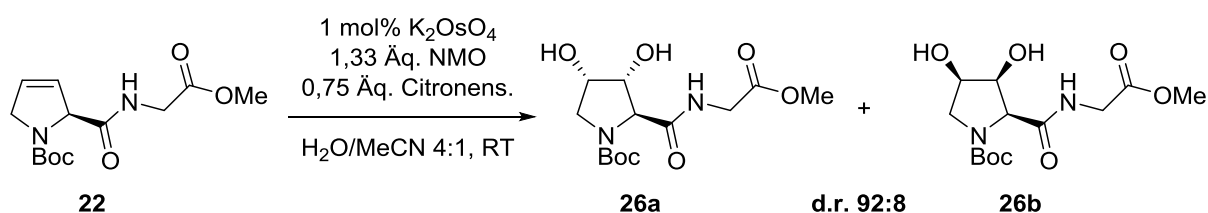


Abbildung 18: Katalysezyklus für die Umsetzung von Boc-Dhp-OMe (**19**) zu Boc-Dyp-OMe (**25a**) nach SHARPLESS *et al.*^[232] Solange Substrat in der Lösung vorhanden ist, kann der Osmium(VI)-bis(glycolat)-Komplex gebildet werden, welcher die Reaktionslösung grün erscheinen lässt (**Rechts:** Reaktionslösung während der Reaktion). Sobald das Substrat komplett umgesetzt wurde, kann kein Bis(glycolat)-Komplex mehr gebildet werden und der Katalysezyklus kommt auf der Stufe des Osmium(VIII)-mono(glycolat)-Komplexes zum Erliegen, worauf sich die Lösung entfärbt (**Links:** Reaktionslösung nach vollständiger Umsetzung des Substrats).

Im Falle der Umsetzung von **19** trat diese Entfärbung nach 1,5 h ein. Eine Analyse mit chromatischen Methoden vor und nach Entfärbung bestätigte diese Beobachtung.

Eine Umsetzung des lieferte dabei analog zur Umsetzung der Aminosäure **19** eine Ausbeute von 83%. Allerdings wurde eine Reaktionszeit von 2 h bis zum vollständigen Umsatz benötigt, was auf eine etwas verlangsamte Reaktionskinetik hindeutet. Eine Bestimmung des Diastereomerenverhältnisses aus dem Rohprodukt mittels 1H -NMR-Spektroskopie war hier aufgrund von starker Signalüberlappung

nicht möglich. Daher wurde die Bestimmung mittels RP-HPLC durchgeführt und ein d.r. von 92:8 bestimmt. Diastereomere können unterschiedliche physikalische Eigenschaften aufweisen, darunter auch unterschiedliche Absorptionskoeffizienten. Da die Detektion der verschiedenen Diastereomere bei der RP-HPLC mit einem *diode-array detector* erfolgte, kann dies zu Problemen bei der d.r.-Bestimmung führen.^[259, 260] Die Isolierten Ausbeuten von **26a** und **26b** mit 76% und 7% bestätigen aber exakt das durch RP-HPLC ermittelte Diastereomerenverhältnis (Schema 13).



Schema 13: Dihydroxylierung des Dipeptids **22** liefert die beiden Diastereomere **26a** und **26b** im Verhältnis 92:8 und 83% Gesamtausbeute.

Die erhöhte Diastereoselektivität lässt sich dadurch erklären, dass die Koordination der Citronensäure im Osmium(VIII)-mono(glycolat)-Komplexes einen deutlich höheren sterischen Anspruch des Katalysators zur Folge hat. In Verbindung mit dem C-Terminalen Glycin, welcher zusätzlichen sterischen Anspruch in den oberen Halbraum bringt, führt dies zum erhöhten Diastereoselektivität im Vergleich zur Umsetzung von Aminosäure **19**.

Anhand beider Diastereomeren ist auch ein Vergleich der in Lösung angenommen Konformation interessant. Zwar wurden von EDWARDS *et al.* bereits eine Vielzahl von mono- und dihydroxylierten Prolin-Derivaten in Dipeptiden hinsichtlich ihrer Konformation in Lösung untersucht, allerdings ist für einen all-*cis* substituierten Dihydroxyprolinring, wie er in **26b** vorkommt, in der Literatur keine Konformation beschrieben.^[61] Charakteristisch ist dabei vor allem der ROE-Kontakt von H_β zu H_δ^{proR} . Da alle 3J -Kopplungskonstanten im Bereich von 4.5-5.5 Hz liegen, ergibt sich eine C_7 -*endo*-Konformation. Für das Diastereomer **26a** konnte hingegen eine C_7 -*exo*-Konformation bestimmt werden, welche mit bereits in der Literatur beschriebenen Daten übereinstimmt (Abbildung 19).^[61]

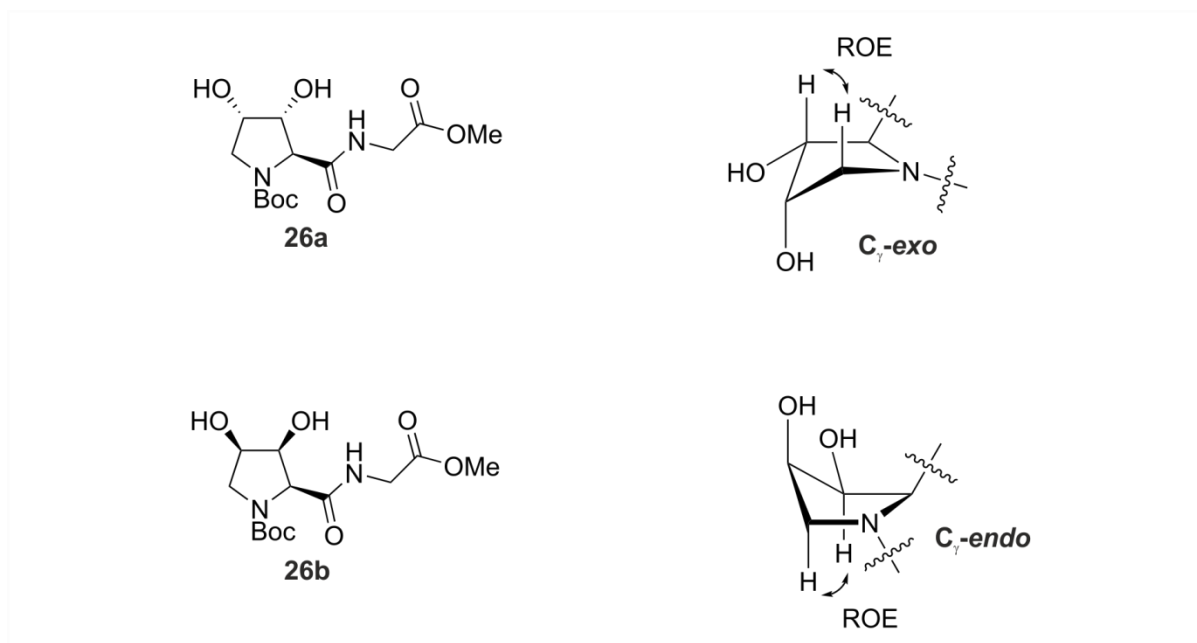
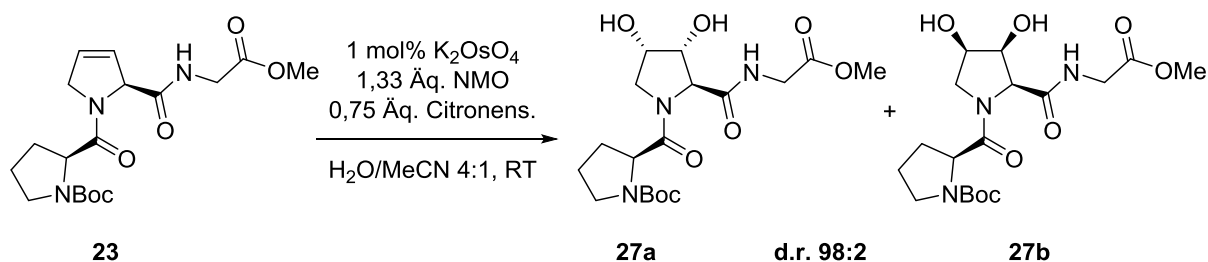


Abbildung 19: Konformationen des Pyrrolidinrings in Lösung. **Oben:** C γ -exo-Konformation des Pyrrolidinrings von Diastereomer **26a**. Eingezeichnet ist dabei der charakteristische ROE-Kontakt von H β zu H δ^{proS} . Außerdem lässt sich deutlich die antiperiplanare Anordnung zwischen der OH-Gruppe in γ -Position und H β sowie H δ^{proS} erkennen. **Unten:** C γ -endo-Konformation des Pyrrolidinrings aus Diastereomer **26b**. Eingezeichnet ist dabei der charakteristische ROE-Kontakt von H β zu H δ^{proR} . Außerdem lässt sich deutlich die antiperiplanare Anordnung zwischen der OH-Gruppe in γ -Position und H β zu H δ^{proR} erkennen. Durch Orbitalwechselwirkung ist diese Konformation trotz der sterischen Wechselwirkung der verschiedenen Substituenten am Pyrrolidinring bevorzugt.

Diese Konformation ist für **26b** auf den ersten Blick ungewöhnlich, da die sterische Wechselwirkung zwischen den Substituenten am Pyrrolidinring recht groß sein sollte. Dass diese Konformation trotzdem eingenommen wird, gibt allerdings einen weiteren Hinweis auf die Bedeutung einer σ - σ^* -Wechselwirkung zwischen dem σ^* -Orbital der C γ -O-Bindung und dem σ -Orbital von einer oder mehreren antiperiplanaren C-H-Bindungen. Diese stereoelektronische Wechselwirkung hat zur Folge, dass bei von Hydroxyfunktionen als Substituent am Prolinring ein Einnehmen der *flagpole*-Position in der *envelope*-Konformation das dominierende Strukturmotiv ist. [61, 75, 83]

Als letzte Modellverbindung wurde die geschützte Kollagen Repetiereinheit Boc-Pro-Dhp-Gly-OMe (**23**) untersucht. Eine Dihydroxylierung, welche nach 2,5 h abgeschlossen war, lieferte ein Diastereomergemisch aus **27a** und **27b** in 80% Gesamtausbeute. Das Diastereomerenverhältnis konnte mittels RP-HPLC auf 98:2 bestimmt werden, was nach Reinigung mittels semipräparativer RP-HPLC auch durch die isolierten Ausbeuten bestätigt werden konnte. (Schema 14)

Ergebnisse und Diskussion



Schema 14: Dihydroxylierung des Tripeptids **23** liefert die beiden Diastereomere **27a** und **27b** im Verhältnis 98:2 und 80% Gesamtausbeute.

Im Vergleich zu Aminosäure **19** und Dipeptid **22**, sowie deren Produkte nach Dihydroxylierung, welche durch das sekundäre Carbamat jeweils als *cis* oder als *trans*-Isomer vorliegen, gibt es durch das zusätzliche sekundäre Amid bei Tripeptiden **23**, **27a** und **27b** je 4 mögliche Isomere. Sowohl bei den Diastereomeren **25a** und **25b**, als auch bei den Diastereomeren **26a** und **26b**, als auch deren Dehydroprolin-Vorläufern **19** und **22** ließ sich ein Isomerenverhältnis zwischen *trans* und *cis* von etwa 67:33 ermitteln. Für die Tripeptide **23**, **27a** und **27b** ergibt sich allerdings ein anderes Bild. Das Dehydroprolin-Derivat **23** weist ein Isomerenverhältnis von 58:36:3:3 auf. Das Hauptdiastereomer **27a** weist mit 55:29:8:8 in vergleichbares Isomerenverhältnis auf. Das Minderdiastereomer **27b** hingegen weist mit 33:31:23:13 in deutlich abweichendes Isomerenverhältnis auf. Hier war durch die hohe Signaldispersion eine genauere NMR-Spektroskopische Untersuchung möglich und es ließen sich alle Isomere zuordnen. Eine Unterscheidung zwischen *cis* und *trans*-Carbamat ließ sich anhand des Unterschiedes zwischen der C_β und C_γ Verschiebung im ^{13}C NMR-Spektrum durchführen. Unterschiede von etwa 5 ppm sind dabei den *trans*-Isomeren, Unterschiede von 7-9 ppm hingegen dem *cis*-Isomer zuzuordnen. Zwar wurden nach dieser Methode vorwiegend Amide untersucht, allerdings ließ diese sich problemlos auf das strukturell ähnliche Carbamat übertragen.^[261–263] Eine weitere Zuordnung konnte mit Hilfe des ROESY-Spektrums getroffen werden. Kreuzsignale von H_α zu H_α sind für *cis*-Amide charakteristisch und treten bei *trans*-Amiden nicht auf. Dieses charakteristische Kreuzsignal konnte auch bei je zwei der vier H_α -Signalsätze beobachtet werden. Somit ließen sich alle vier Isomeren zuordnen. In Übereinstimmung mit dieser Zuordnung war zudem eine Analyse des konformationellen Austauschs möglich. Für die vier NH-Protonen konnten je zwei Kreuzsignale mit der gleichen Phase wie das Diagonalsignal, was für

konformationellen Austausch im ROESY-Spektrum charakteristisch ist, beobachtet werden. Kreuzsignale einer dipolaren Kopplung hingegen weisen im ROESY-Spektrum eine dem Diagonalsignal entgegengesetzten Phase auf. Diese beiden Kreuzsignale haben dabei auch deutlich verschiedene Intensitäten. Das Kreuzsignal mit hoher Intensität tritt dabei zwischen den beiden Isomeren aus, welche sich in der Konfiguration des Carbamats unterscheiden. Ein Kreuzsignal mit niedriger Intensität ließ sich dagegen zwischen den NH-Protonen der Spezies beobachten, bei welchen sich die Amid-Konfiguration unterscheidet. Dies lässt sich damit erklären, dass die Rotationsbarriere eines Carbamats deutlich geringer ist, als die eines Amids.^[61, 264]

Dieses Isomerenverhältnis von Diastereomer **27b** ist insoweit erstaunlich, als das das Carbamat zu 64% *cis*-konfiguriert ist und damit deutlich höher als die bisher beobachteten 30-40%. Das Amid hingegen ist zu 45% *cis*-konfiguriert (Abbildung 20). Dieser Wert liegt zwar auch höher als üblich, jedoch ist bei hydroxylierten Prolinen, welche die Hydroxyfunktion in 3- bzw. 4-Position im Vergleich zu **27b** in gleicher Konfiguration aufweisen, eine deutlich höhere Tendenz zur *cis*-konfigurierten Amidbindung beschrieben.^[61]

Ergebnisse und Diskussion

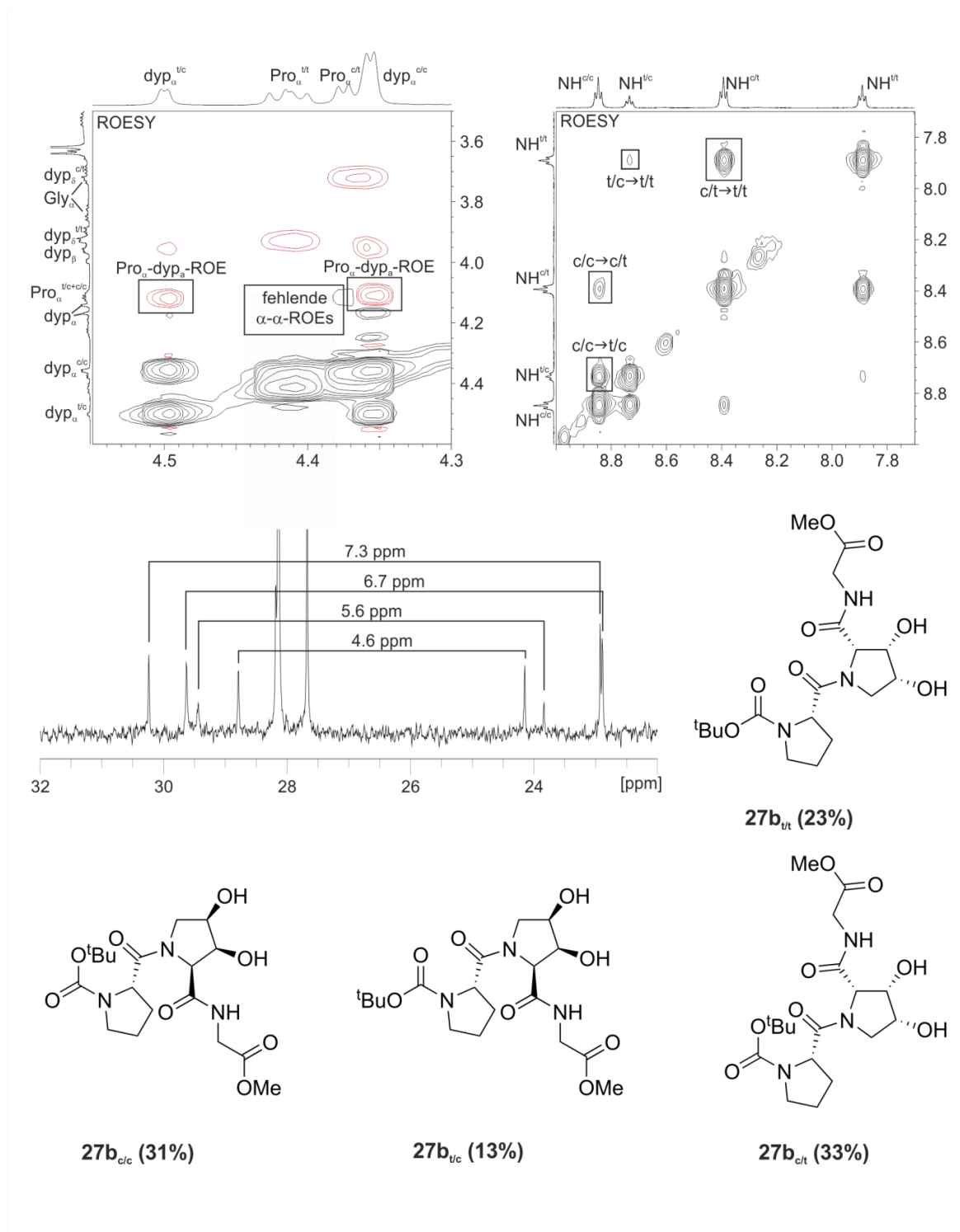
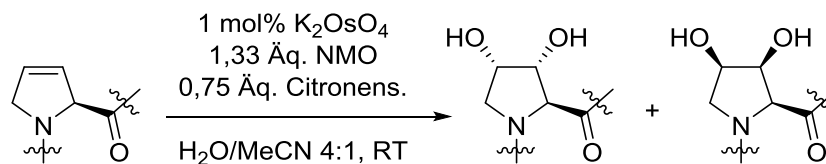


Abbildung 20: Zuordnung aller vier *cis-trans*-Isomere von Diastereomer **27b**. **Oben links:** Ausschnitt aus dem ROESY-Spektrum (500 MHz, 300 K, DMSO- d_6) der Verbindung **27b**. Markiert sind die beiden für eine *cis*-Amidbindung charakteristischen α - α -ROE-Kontakte. Für die beiden anderen Isomere fehlen diese Kreuzsignale und machen damit eine eindeutige Zuordnung von *cis*- und *trans*-Amiden möglich. **Oben rechts:** Ausschnitt aus dem ROESY-Spektrum (500 MHz, 300 K, DMSO- d_6) der Verbindung **27b**. Deutlich zu erkennen sind die unterschiedlichen Intensitäten der Kreuzsignale für konformationellen Austausch, je nachdem, ob die zugrundeliegende Rotation um das Amid (schwache Intensität und damit große Barriere) oder das Carbamat (starke Intensität und damit kleine Barriere) erfolgt. **Mitte:** Ausschnitt aus dem ^{13}C NMR-Spektrum (125 MHz, 300 K, DMSO- d_6) der Verbindung **27b**. Der Unterschied der chemischen Verschiebung zwischen C_β (links) und C_γ (rechts) ist für das *cis*-Carbamat größer als für das *trans*-Carbamat und ermöglicht damit die Zuordnung. **Unten:** Struktur der verschiedenen Isomere.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Dihydroxylierung der Modellverbindungen **19**, **22** und **23** einige eindeutige Trends zeigt. Zum einen nimmt die Diastereoselektivität der Dihydroxylierung mit steigender Aminosäureanzahl von 84:16 bei der einzelnen Aminosäure **19**, über 92:8 beim Dipeptid **22** auf 98:2 beim Tripeptid **23** zu. Diese Verbesserung in der Diastereoselektivität ist vor allem für die mögliche Dihydroxylierung von komplexeren Peptidstrukturen von großer Bedeutung, da das Abtrennen von Nebenprodukten hier zu Problemen führen kann (vgl. Kapitel 3.1.1.). Des Weiteren ist in diesem Kontext zu erwähnen, dass die Reaktionszeit mit steigender Molekularmasse zunimmt.^[265, 266] Zwar steigt die Reaktionszeit von 1,5 h, bei Umsetzung von Aminosäure **19** auf 2,5 h bei Tripeptid **23** nur moderat an, jedoch sind bei längeren Peptidsequenzen längere Reaktionszeiten zu erwarten, die ein erneutes Anpassen der Reaktionsbedingungen nötig machen können. Die Umsetzungen der Modellverbindungen sind in Tabelle 10 noch einmal zusammengefasst.

Tabelle 10: Umsetzungen der Modellverbindungen **19**, **22** und **23** in der Dihydroxylierung, sowie die beobachteten Ausbeuten, Diastereomerenverhältnisse und Reaktionszeiten.



Verbindung	Ausbeute ^a	d.r.	Reaktionszeit ^d
19	87%	84:16 ^b	1,5 h
22	83%	92:8 ^c	2,0 h
23	80%	98:2 ^c	2,5 h

^aGesamtausbeute beider Diastereomeren. ^bBestimmt mittels ¹H-NMR-Spektrum des Rohprodukts.

^cBestimmt aus dem RP-HPLC-Chromatogramm des Rohprodukts. ^dBestimmt durch HPLC-Chromatogramm nach Farbumschlag.

3.1.6. Synthese und Dihydroxylierung von Dehydroprolin-haltigen Kollagen-Modellpeptiden

Ausgehend von den Tripeptid-Bausteinen Fmoc-Pro-Hyp^{tBu}-Gly-OH (**7**) und Fmoc-Pro-Dhp-Gly-OH (**24**) war es nun möglich das *host-guest* Kollagen-Modellpeptid Ac-(Pro-Hyp-Gly)₃-Pro-Dhp-Gly-(Pro-Hyp-Gly)₃-NH₂ (**28**) darzustellen. Dies gelang mit den in Kapitel 3.1.1. beschriebenen SPPS-Bedingungen in 25% Ausbeute nach Reinigung mittels semipräparativer RP-HPLC. Anhand dieser Verbindung ließ sich

besonders gut Untersuchen wie diese Art von Peptiden in wässriger Lösung vorliegt. Dazu wurde sich zunutze gemacht, dass sich der N-terminale Acetylrest und das C-terminale Carboxamid der verschiedenen Spezies in Lösung unterscheiden ließen, was auch schon bei Referenzverbindung **8** beobachtet werden konnte. Jedoch bot das Dehydroprolin, welches exakt in der Mitte der Peptidsequenz lokalisiert ist, die Möglichkeit das Verhalten der Enden der Tripelhelix mit dem Verhalten des Helixkerns zu vergleichen. Dazu wurde sich zunutze gemacht, dass die olefinischen Protonen im ^1H -NMR-Spektrum separiert von den anderen vorlagen. Hier soll konkret die Frage beantwortet werde, ob die Näherung eines zwei-Zustands-Modells für die thermische Entfaltung für diese Verbindungsklasse zutreffend ist.

Im ^1H -NMR-Spektrum von **28** konnten dabei für das hochfeldige Carboxamid-Proton, für den Acetylrest und für das β - und γ -Proton des Dehydroprolins je vier Signalsätze beobachtet werden. Es liegt nahe, dass es sich bei den verschiedenen Signalsätzen um den *lagging*-, *middle*- und *leading-strand* der Tripelhelix sowie um den nicht assemblierten Einzelstrang handelt. Um dies näher zu Untersuchen und etwaige Temperatureffekte bei der Messung auszuschließen, wurde sich die Hysterese der Faltung zunutze gemacht. Dazu wurde ein ^1H -NMR-Spektrum im Gleichgewicht bei 300 K gemessen. Nach erhitzen der Probe, also der vollständigen Entfaltung der Tripelhelix, wurde erneut ein ^1H -NMR-Spektrum bei 300 K aufgenommen. Durch die schnelle Abkühlung sollte sich durch die Hysterese noch kein Gleichgewicht eingestellt haben. Dabei konnte beobachtet werden, dass die Signalintensität von je drei der vier Signale geringer und ein Signal intensiver war, als bei der ersten Messung (Abbildung 21).

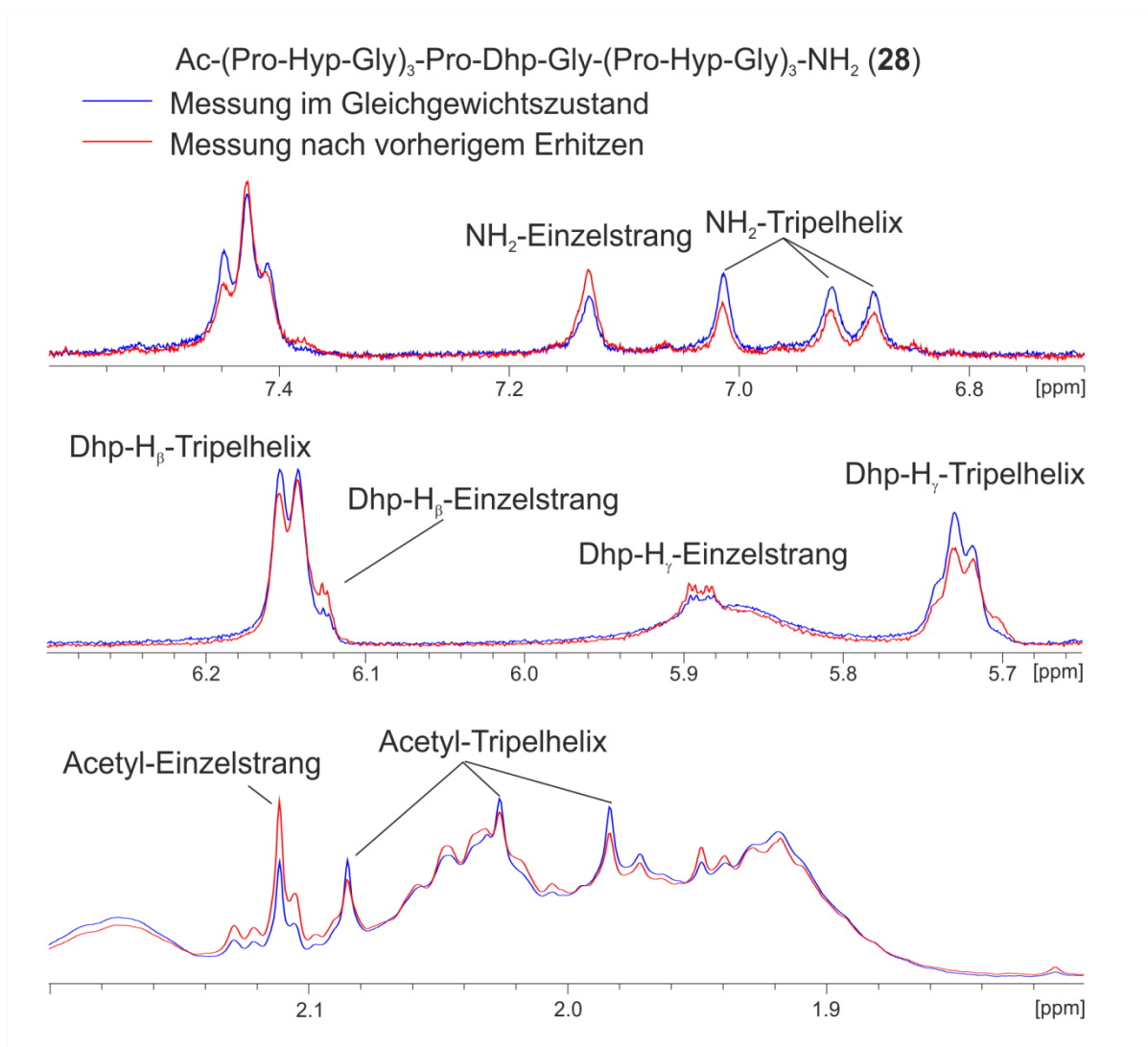


Abbildung 21: Ausschnitte aus den ¹H-NMR-Spektren (600 MHz, 300 K, H₂O/D₂O 9:1) von Ac-(Pro-Hyp-Gly)₃-Pro-Dhp-Gly-(Pro-Hyp-Gly)₃-NH₂ (**28**). **Oben:** Ausschnitt mit Carboxamid-Signalen. **Mitte:** Ausschnitt mit olefinischen Signalen des Dehydroprolins. **Unten:** Ausschnitt mit Acetyl-Signalen. Das ¹H-NMR-Spektrum der Messung im Gleichgewichtszustand ist dabei in blau dargestellt. Das ¹H-NMR-Spektrum der Messung welche nach 15 minütigem Erhitzen auf 80 °C und schnellem Abkühlen durchgeführt wurde, ist in rot dargestellt. Deutlich zu sehen ist der höhere Anteil an Tripelhelix im Gleichgewichtszustand.

Zu erwähnen ist dabei, dass die unterschiedlichen Signalintensitäten für das hochfeldige Carboxamid-Signal und die Dhp-H_β- und -H_γ-Protonen miteinander korrelieren. Das heißt, der Intensitätsverlust von 15% (5% Intensitätsverlust für jedes der drei Signale der tripelhelikalen Spezies) der für die tripelhelikale Spezies gemessen wurde, lässt sich für das Einzelstrang-Signal als Intensitätsgewinn von 15% messen. Für die Acetyl-Signale ließ sich derselbe Effekt beobachten, eine genaue Quantifizierung war jedoch durch Signalüberlappung nicht möglich, sollte aber auch im beschriebenen Bereich liegen. Diese Beobachtung ist insoweit von enormer Wichtigkeit, als das für Kollagen-Modellpeptide dieser Länge, also mit sieben Repetiereinheiten, NMR-spektroskopisch nur zwischen Tripelhelix und

Einzelstrang unterschieden werden kann. Teilgefaltete Strukturen, beispielsweise durch eine Entfaltung am N- oder C-Terminus, können mittels NMR-Spektroskopie nicht aufgelöst werden. Dieses zwei-Zustands-Modell ist also für Kollagen-Modellpeptide zum Beschreiben der Faltung oder Entfaltung geeignet. Allerdings muss das gängige Modell um den tatsächlichen Anteil an tripelhelikaler Spezies präzisiert werden, da NMR-spektroskopisch gezeigt werden konnte, dass 20% des Kollagen-Modellpeptids in Lösung als Einzelstrang vorliegt. Bei CD-spektroskopischen Methoden wird der höchste gemessene CD-Wert als 100% Faltungsanteil definiert.^[27, 56, 192, 267] Für längere Kollagen-Modellpeptide, beispielsweise mit zehn Repetiereinheiten, welche in der Literatur ebenfalls häufig beschrieben worden sind, stellt das zwei-Zustands-Modell hingegen eine deutlich schlechtere Näherung dar. Das liegt vor allem daran, dass auch teilgefaltete Strukturen NMR-spektroskopisch beobachtet werden können.^[64, 67, 68] Dies betrifft vor allem das *fraying* am N- und C-Terminus. Für Kollagen-Modellpeptide mit sieben oder weniger Repetiereinheiten scheint dieses *fraying*, also dem Aufschmelzen vom C- oder N-Terminus aus, allerdings zu einer Spezies mit so kurzer Lebensdauer zu führen, dass nur Einzelstrang oder Tripelhelix beobachtet werden können. Dies macht die in Kapitel 3.1.2. beschriebene NMR-basierte Schmelzpunktbestimmung für Kollagen mit sieben Repetiereinheiten zu einer sehr genauen Methode. Jedoch kann eine Untersuchung von Kollagenverbindungen bei denen die Lebensdauer von teilgefalteten Spezies so lang ist, dass diese NMR-spektroskopisch beobachtet werden kann, zu Problemen bei der Schmelzpunktbestimmung führen.

Eine Dihydroxylierung von Kollagen-Modellpeptid **28** stellt eine deutlich größere Herausforderung dar als die Umsetzung der in Kapitel 3.1.5. beschriebenen Fragmente. Dabei sind für Verbindungen mit hoher Komplexität bzw. Molmasse schlechte Ausbeuten und Reaktionszeiten von mehreren Tage bis zu einer Woche keine Seltenheit, außerdem sind deutlich potentere Oxidationsmittel wie NaIO_4 für eine Umsetzung notwendig.^[265, 266] Die zur Tripelhelix assemblierte Verbindung **28** hat dabei ohne Schutzgruppen eine Molmasse von etwa 6 kDa. Die Verbindung mit der höchsten Molmasse bei der eine Dihydroxylierung beschrieben ist liegt mit 2,6 kDa deutlich darunter, wobei 60% der Masse auf Schutzgruppen entfallen.^[265] Bei der Umsetzung dieser Verbindung wurden dabei eine Vielzahl verschiedener Reaktionsbedingungen getestet, wobei überhaupt nur bei einer einzigen Umsatz beobachtet werden konnte, was noch einmal die Herausforderung dieser Reaktion

von **28** verdeutlicht.^[265] Für die Umsetzung wurde H₂O als Lösungsmittel gewählt und auf ein Cosolvens verzichtet um die Bildung der tripelhelikalen Spezies in Lösung zu gewährleisten und die Lösung nach der Reaktion ohne weitere Aufarbeitung mittels semipräparativer RP-HPLC reinigen zu können. Außerdem wurde die Katalysatorbeladung auf 10 mol% erhöht um der erwarteten langsameren Reaktionskinetik Rechnung zu tragen. Die Menge NMO (1,33 Äq.) und Citronensäure (0,75 Äq.) blieb hingegen unverändert. Als Eduktkonzentration erwies sich eine Konzentration vom 1 mM als bester Kompromiss zwischen Eduktmenge und Lösungsmittelvolumen. Da allerdings nach 14 Tage erst 70% Umsatz erreicht waren wurden noch einmal 10 mol% K₂OsO₄, 1,33 Äq. NMO und 0,75 Äq. Citronensäure zugegeben. Dies steigerte den Umsatz innerhalb der nächsten 7 Tage noch einmal um 12% auf nun 82%. Die Zugabe von weiteren 20 mol% K₂OsO₄, 1,33 Äq. NMO und 0,75 Äq. Citronensäure konnte den Umsatz nach insgesamt 28 Tagen letztlich auf 96% steigern (Abbildung 22).

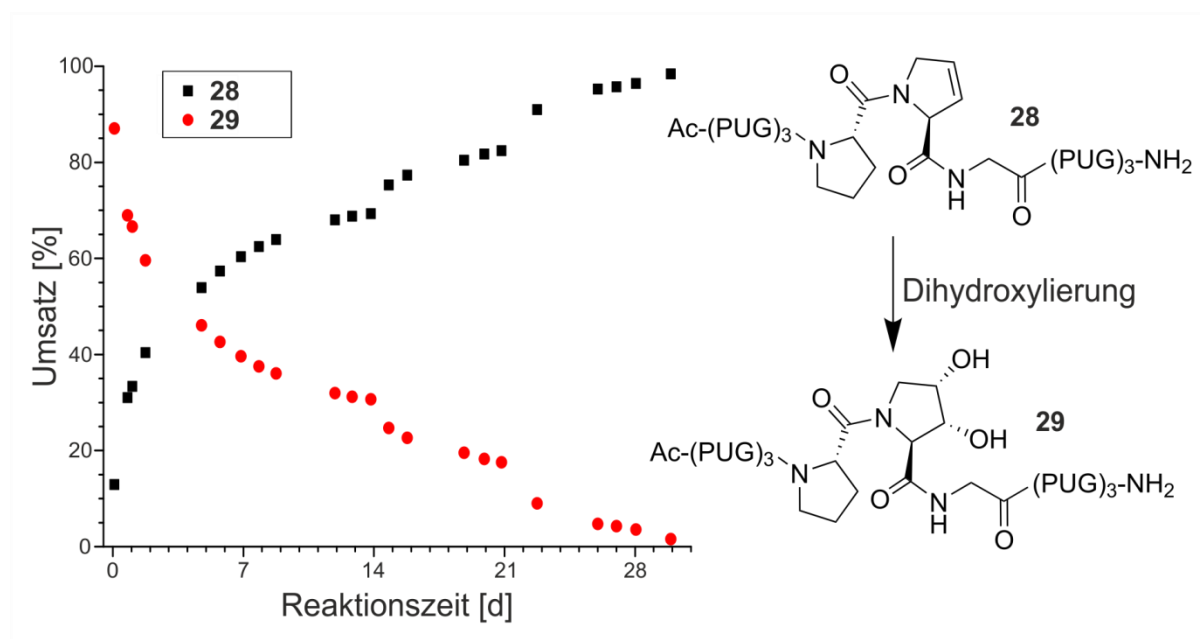


Abbildung 22: Dihydroxylierung von Ac-(Pro-Hyp-Gly)₃-Pro-Dhp-Gly-(Pro-Hyp-Gly)₃-NH₂ (**28**) zu Ac-(Pro-Hyp-Gly)₃-Pro-Dyp-Gly-(Pro-Hyp-Gly)₃-NH₂ (**29**) mit 10 mol% K₂OsO₄, 1,33 Äq. NMO und 0,75 Äq. Citronensäure in H₂O. Nach 14 Tagen wurden 10 mol% K₂OsO₄, 1,33 Äq. NMO und 0,75 Äq. Citronensäure und nach insgesamt 21 Tagen noch einmal 20 mol% K₂OsO₄, 1,33 Äq. NMO und 0,75 Äq. Citronensäure zugegeben.

Wie bereits zuvor vermutet, ließ sich für die Dihydroxylierung von Kollagen-Modellpeptid **28** eine extrem langsame Reaktionskinetik beobachten. Erst eine extrem lange Reaktionszeit und die mehrfache Zugabe von Katalysator, Oxidationsmittel und Additiv im Laufe der Reaktion lieferte vollständigen Umsatz.

Erstaunlich ist dabei vor allem, dass der Umsatz im Laufe der Reaktion stagnierte. Dies legt den Schluss nahe, dass der Katalysator im Laufe der Reaktion eine Form annimmt, in der er nicht mehr katalytisch aktiv ist. Dafür sind mehrere Möglichkeiten denkbar. Zum einen die Bildung des hydrolysestabilen Osmium-Glycolats, wobei die Bildung durch den Zusatz von Citronensäure unterdrückt werden sollte.^[232] Zum anderen die Komplexbildung und damit eine Vergiftung des Katalysators.^[102] Um dies näher zu untersuchen wurde die Dihydroxylierung von **28** mit unterschiedlichen Katalysatorbeladungen durchgeführt. Dazu wurden Beladungen von 10, 30 und 120 mol% untersucht. Außerdem wurde das Kollagen-Modellpeptid **28** für diese Umsetzung in H₂O gelöst und 24 Stunden bei 4 °C gelagert, um mögliche Effekte durch Aggregation ausschließen zu können. Mittels RP-HPLC wurde der Umsatz der Dihydroxylierung verfolgt (Abbildung 23).

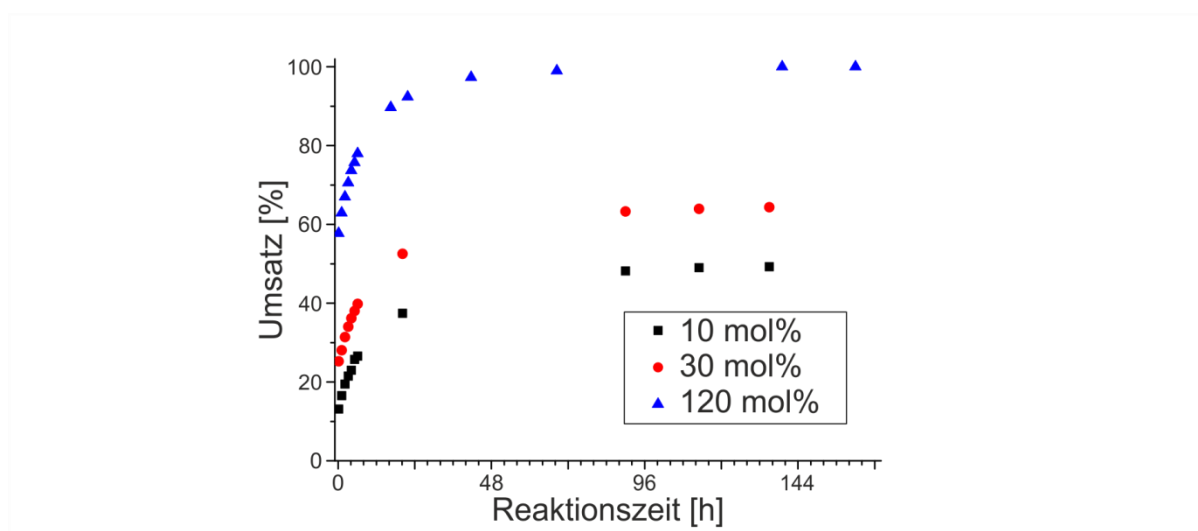


Abbildung 23: Dihydroxylierung des Kollagen-Modellpeptids **28** mit Katalysatorbeladungen von 10 mol% (schwarz), 30 mol% (rot) und 120 mol% (blau). Deutlich zu sehen ist, dass nur der überstöchiometrische Einsatz von Kaliumosmat zu einem vollständigen Umsatz führt. Mit einer Katalysatorbeladung von 10 und 30 mol% stagniert der Umsatz zum Produkt **29** bei 49 bzw. 64%.

Deutlich zu sehen ist, dass bei allen Umsetzungen nach 96 Stunden Reaktionszeit ein Plateau, also kaum weiterer Umsatz, beobachtet werden konnte und nur der Einsatz überstöchiometrischer Mengen K₂OsO₄ zu vollständigem Umsatz führt. Durch diese Beobachtung konnte auch ein Einfluss durch eine Aggregation, also die Unzugänglichkeit des Dehydroprolins ausgeschlossen werden, da ein solcher Effekt unabhängig von der Katalysatorbeladung sein sollte. Außerdem verläuft die Umsatzkurve bei 10 mol% Katalysatorbeladung im Vergleich zu der in Abbildung 22 ähnlich, flacht aber deutlich früher ab. Dies lässt sich damit erklären, dass die

Kollagen-Modellpeptid Lösung dort nicht 24 h äquiliibriert wurde und eine Dihydroxylierung von noch nicht zur Tripelhelix aggregierten Einzelsträngen den Umsatz erhöht. Da ein Einfluss von hochmolekularen Aggregaten ausgeschlossen werden kann, ist ein direkter Einfluss der tripelhelikalen Struktur eine mögliche Erklärung. Eine Komplexierung des Osmium-Katalysators durch tripelhelikales Kollagen-Modellpeptid **29** oder Heterotrimere aus **28** und **29** ist dabei nicht auszuschließen, da diese Verbindungen als potenten Chelatligand fungieren können. Außerdem sind eine gehemmte Hydrolyse bzw. Oxidation einer Glycolat-Spezies dabei denkbare Möglichkeiten, welche einen Katalysezyklus zum Erliegen bringen können.^[232] Dabei ist eine intertripelhelikale Komplexierung, welche auch schon für die Komplexierung von Metallen, bei speziell dafür modifizierte Kollagen-Modellpeptiden beschrieben wurde, am wahrscheinlichsten.^[268] Um den Einfluss dieser tripelhelikalen Spezies zu untersuchen, wurde die Dihydroxylierung bei erhöhter Temperatur durchgeführt. Als Reaktionstemperatur wurde 60 °C gewählt, da diese oberhalb der Schmelztemperatur liegt. Als Kontrolle wurde die Reaktion unter denselben Bedingungen noch einmal bei Raumtemperatur durchgeführt und erst nach Erreichen des Plateaus auf 60 °C erhitzt (Abbildung 24).

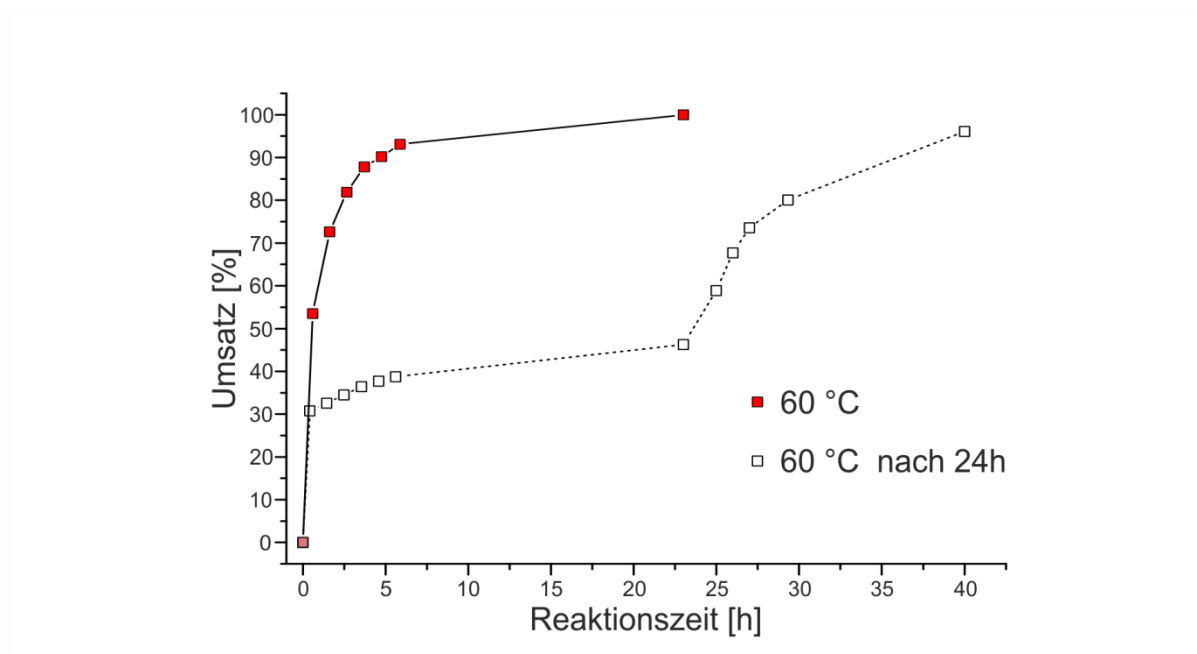
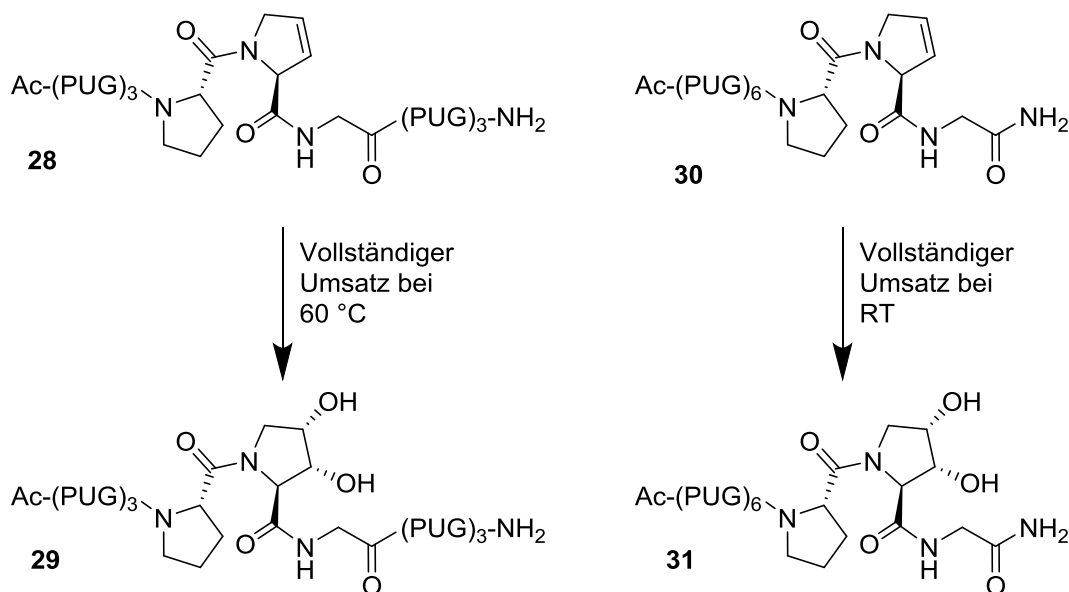


Abbildung 24: Dihydroxylierung von **28** mit 20 mol% K_2OsO_4 , 1,33 Äq. NMO und 0,75 Äq. Citronensäure in H_2O . Eine Reaktionstemperatur von 60 °C (rot) lieferte nach 24 h vollständigen Umsatz während für die Reaktion welche bei Raumtemperatur durchgeführt wurde (weiß), lediglich 45% Umsatz zeigte, konnte nach einem Erhitzen auf 60 °C auch hier nahezu vollständiger Umsatz beobachtet werden

Dabei konnte beobachtet werden, dass eine Reaktionstemperatur von 60 °C, bei welcher das Kollagen-Modellpeptid **28** als Einzelstrang in Lösung vorliegt, zu einer deutlichen Verbesserung des Umsatzes führt. Nach 5 Stunden konnten 90% und nach 24 Stunden vollständiger Umsatz beobachtet werden. Eine Durchführung der Reaktion bei Raumtemperatur führte wie erwartet zu einem Stagnieren der Umsatzkurve bei etwa 50% Umsatz. Jedoch konnte durch ein Erhitzen der Reaktionslösung auf 60 °C vollständiger Umsatz nach weiteren 16 Stunden erreicht werden. Diese Beobachtung legt den Schluss nahe, dass die Assemblierung zur Tripelhelix für den unvollständigen Umsatz verantwortlich ist, indem der Katalysezyklus gehemmt, oder der Katalysator komplexiert wird. Durch ein Erhitzen und die damit verbundene Disassemblierung ließ sich dieses Problem allerdings lösen. Bei allen durchgeführten Reaktionen ließ sich außerdem kein zweites Diastereomer beobachten, die erhöhte Reaktionstemperatur hat also keine verschlechterte Diastereoselektivität der Reaktion zu Folge, sodass sich eine Umsetzung von **28** problemlos in den in Kapitel 3.1.5. einreicht. Mit den so optimierten Reaktionsbedingungen ließ sich das dihydroxylierte Kollagen-Modellpeptid **29** (20 mol% K_2OsO_4 , 1,33 Äq. NMO, 0,75 Äq Citronensäure, H_2O , 60 °C) in 99% Ausbeute ausgehend von **28** darstellen. Da bei der Reaktion keinerlei Nebenprodukte beobachtet wurde, stellte eine direkte Reinigung der Reaktionslösung mittels semipräparativer RP-HPLC kein Problem dar. Um zu untersuchen, ob das Problem eines unvollständigen Umsatzes in der Dihydroxylierung mit der Lage des Dehydroprolins in der Mitte der Tripelhelix zusammenhängt, wurde mit Ac-(Pro-Hyp-Gly)₆-Pro-Dhp-Gly-NH₂ (**30**) ein Kollagen-Modellpeptid synthetisiert, bei dem die Doppelbindung des Dehydroprolins am C-Terminus lokalisiert ist und ebenso eine Tripelhelix bildet. Dies sollte sowohl eine bessere Zugänglichkeit der Doppelbindung zur Folge haben als auch die Umgebung der Doppelbindung ändern um eine etwaige Komplexierung des Osmiums zu verhindern. Eine Dihydroxylierung von **30** konnte dabei mit 20 mol% K_2OsO_4 , 1,33 Äq. NMO und 0,75 Äq. Citronensäure in H_2O bei Raumtemperatur und einer Reaktionszeit von 3 Tagen durchgeführt werden (Schema 15). Das dihydroxylierte Kollagen-Modellpeptid Ac-(Pro-Hyp-Gly)₆-Pro-Dyp-Gly-NH₂ (**31**) konnte dabei in 80% Ausbeute erhalten werden.



Schema 15: Dihydroxylierung von **28** und **30** mit 20 mol% K_2OsO_4 , 1,33 Äq. NMO und 0,75 Äq. Citronensäure in H_2O . Bei der Umsetzung von **28** war ein Erhitzen auf 60 °C und damit über die Schmelztemperatur nötig. Verbindung **30** hingegen ließ sich bei Raumtemperatur umsetzen.

Diese Beobachtungen bestätigen erneut, dass die Lage der Doppelbindung großen Einfluss auf den Ablauf der Dihydroxylierung von Kollagen-Modellpeptiden hat und eine Komplexierung des Katalysators im Falle der Dihydroxylierung von **28** am wahrscheinlichsten ist, während bei der Umsetzung von **30**, welche die Funktionalität am C-Terminus aufweist, dieses Problem nicht auftritt.

3.1.7. Einfluss der Dihydroxyfunktion auf die Schmelztemperatur

Mit Hilfe des dihydroxylierten Kollagen-Modellpeptids **29** ließ sich nun der Einfluss der Hydroxylierung bzw. dem korrespondierenden *puckering* der Aminosäure in Yaa-Position eines *host-guest* Kollagen-Modellpeptides näher untersuchen. Dazu wurde als weitere Referenz das Kollagen-Modellpeptid $Ac-(Pro-Hyp-Gly)_3-Pro-Pro-Gly-(Pro-Hyp-Gly)_3-NH_2$ (**32**), welches in der mittleren Repetiereinheit in Prolin in Yaa-Position aufweist, synthetisiert. Diese Modellverbindung ist zwar bereits beschrieben, allerdings sind noch keine NMR-spektroskopischen Untersuchungen zu ebendieser bekannt.^[56]

Der Schmelzpunkt der Modellverbindungen **8**, **28**, **29** und **32** wurde nun NMR-spektroskopisch nach der in Kapitel 3.1.2. beschriebenen Methode ermittelt. Dabei ergab sich für das Referenzpeptid **8** eine Schmelztemperatur von 44,6 °C, für das Dehydroprolin-Derivat **28** eine Schmelztemperatur von 40,2 °C, für das Dihydroxyprolin-Derivat **29** eine Schmelztemperatur von 35,8 °C und für das

Kollagen-Modellpeptid mit Prolin in Yaa-Position **32** eine Schmelztemperatur von 39,0 °C (Abbildung 25).

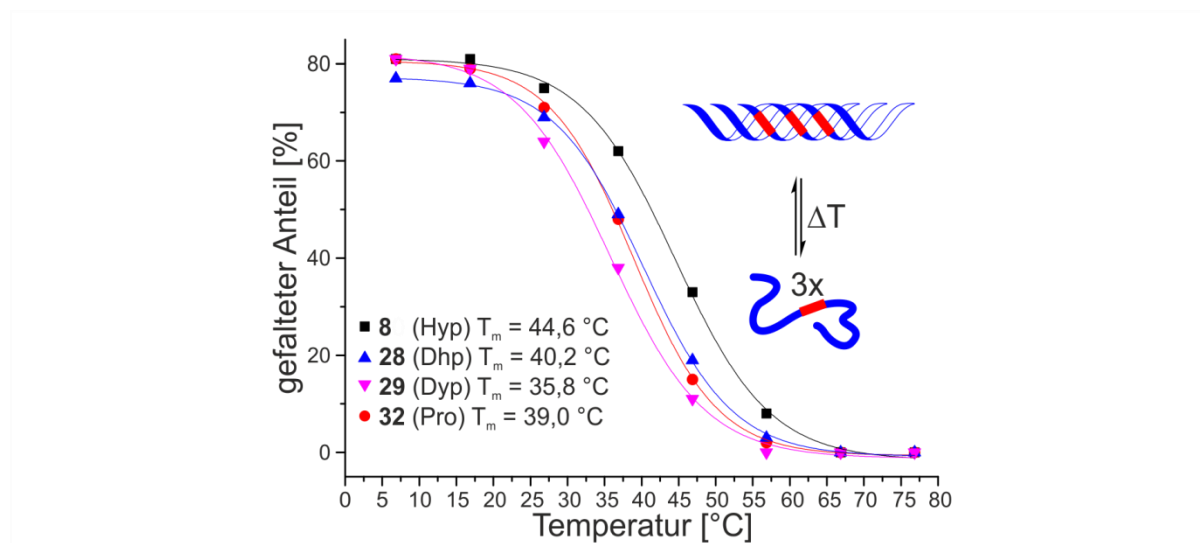


Abbildung 25: Mittels ^1H -NMR-Spektroskopie (500 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1, 3 mm) ermittelte Schmelzkurven von **8** ($T_m = 44,6$ °C), **28** ($T_m = 40,2$ °C), **29** ($T_m = 35,8$ °C) und **32** ($T_m = 39,0$ °C).

Auffällig ist vor allem, dass sich der maximale gefaltete Anteil bei etwa 7 °C zwischen den Kollagen-Modellpeptiden so gut wie nicht unterscheidet. Er liegt für die Verbindungen **8**, **29** und **32** bei 81%. Lediglich für das Dehydroprolin-Derivat **28** liegt der maximal gefaltete Anteil mit 77% knapp darunter. Dies ist insoweit erstaunlich, als das für Peptide oder Proteine oft eine direkte Korrelation zwischen der thermischen Stabilität, also dem Aufschmelzen einer Struktur, und deren Population besteht bzw. angenommen wird.^[269, 270] Hier kann jedoch gezeigt werden, dass dieser Zusammenhang für Kollagen-Modellpeptide nicht zutrifft. Vielmehr lässt sich mit dem Anteil an gefalteter Spezies lediglich die Lage des Gleichgewichtes zwischen Einzelstrang und Tripelhelix beschreiben. Während der Schmelzpunkt die Stabilität der Tripelhelix charakterisiert.

Somit ist es naheliegend die Schmelztemperatur in eine Beziehung zur Struktur der Kollagen-Modellpeptide zu bringen. Dazu sind vor allem zwei Parameter von enormer Wichtigkeit, die Hydroxylierung und das damit eng verbundene *puckering* des Pyrrolindin- bzw. Pyrrolinrings. Es bietet sich bei dieser Betrachtung an, Kollagen-Modellpeptid **32** mit einer Schmelztemperatur von 39,0 °C, welches unsubstituiert ist und ein C_γ -endo *puckering* aufweist, als Referenz zu betrachten und nach oben oder unten abweichende Schmelztemperaturen in Verbindung mit Substitution und *puckering* zu diskutieren. Als einziges Kollagen-Modellpeptid

welches an der entsprechenden Aminosäure in Yaa-Position keine Hydroxysubstituenten aufweist ist das Dehydroprolin-Derivat **28**. Wie bereits in Kapitel 3.1.3. gezeigt, kann der Pyrrolinring als *unpuckered* beschrieben werden. Der Schmelzpunkt liegt dabei mit 40,2 °C etwas höher. Da bereits bekannt ist, dass für Aminosäuren in Yaa-Position ein C_γ-exo puckering zu höheren Schmelztemperaturen führt, liegt es nahe, dass bereits ein Eliminieren des C_γ-endo *puckerings* die Erhöhung des Schmelzpunktes um 1,2 °C erklärt (Abbildung 26).^[56]

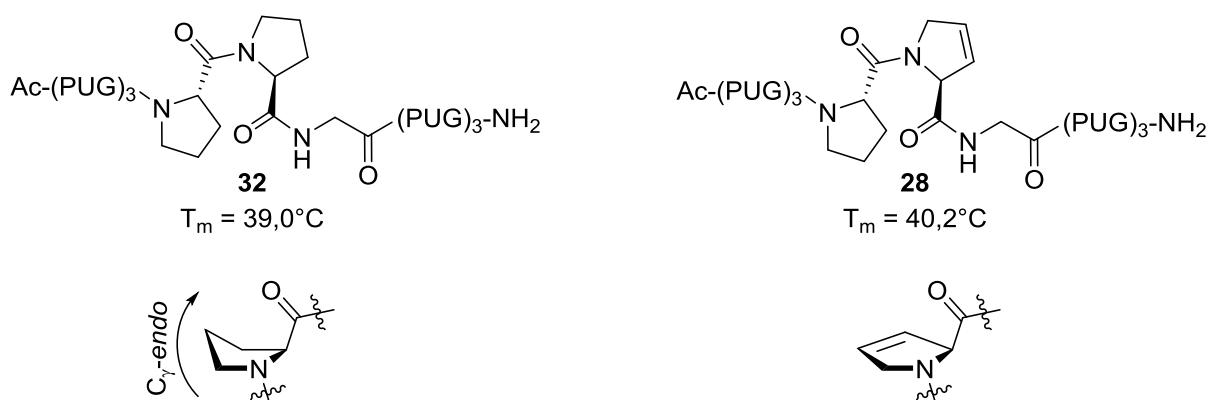


Abbildung 26: Vergleich zwischen den beiden nicht hydroxylierten Kollagen-Modellpeptiden. **Links:** Prolin-Derivat **32** mit einer Schmelztemperatur von 39,0 °C. Der Pyrrolidinring liegt dabei in einer C_γ-endo-Konformation vor. **Rechts:** Dehydroprolin-Derivat **28** mit einer Schmelztemperatur von 40,2 °C. Der Pyrrolinring zeigt dabei kein *puckering*.

Vergleicht man dies mit dem Hydroxyprolin-Derivat **X**, stellt man fest, dass die Schmelztemperatur mit 44,6 °C höher liegt (5,6 °C) als bei Kollagen-Modellpeptid **32**. Dabei sind vor allem zwei Einflüsse zu diskutieren. Zum einen den Einfluss der veränderten Konformation des Pyrrolidinrings und zum anderen die zusätzliche Hydroxyfunktion, welche in der Lage ist Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden. Zur Stabilisierung tragen jedoch beide Effekte bei. Eine O-Methylierung oder das Verwenden von 4-Fluorprolinen und damit eine Eliminierung der Wasserstoffbrückdonoreigenschaften führt dabei ebenfalls zu einer Stabilisierung der Tripelhelix.^[53, 71, 233] Studien zum 4-Mercaptoprolin, welche ebenfalls Wasserstoffbrückdonoreigenschaften haben, allerdings ein inverses *puckering* aufweisen, zeigten ebenfalls eine stabilisierende Wirkung.^[252] Beide Stabilisierungen isoliert betrachtet sind allerdings nicht so groß wie die Kombination aus beiden. Bei der Betrachtung von Dihydroxyprolin-Derivat **29** kommt der Substituent in 3-Position als weiterer entscheidender Faktor hinzu. Es ist bekannt, dass 3-Hydroxyprolin in Yaa-Position eine drastische Verringerung der Schmelztemperatur von 15 °C

gegenüber dem 4-Hydroxyprolin-Derivat zur Folge hat.^[83] Diese Destabilisierung kann sowohl auf die C_β-*exo*-Konformation des Pyrrolidinrings, als auch auf eine sterische Wechselwirkung mit dem Nachbarstrang innerhalb Tripelhelix zurückgeführt werden. Aufgrund dieser generellen Destabilisierung sind 3-Substituierte Prolin-Derivate in Kollagen-Modellpeptiden kaum untersucht. Das Gleiche gilt für 3,4-Substituierte Proline. Das Dihydroxyprolin-Derivat **29** ist damit allerdings eine Ausnahme. Durch die C_γ-*exo*-Konformation ist die Ähnlichkeit zu Prolinen mit Substituenten in 4-Position deutlich größer als zu Derivaten mit Substituenten in 3-Position (Abbildung 27).^[61]

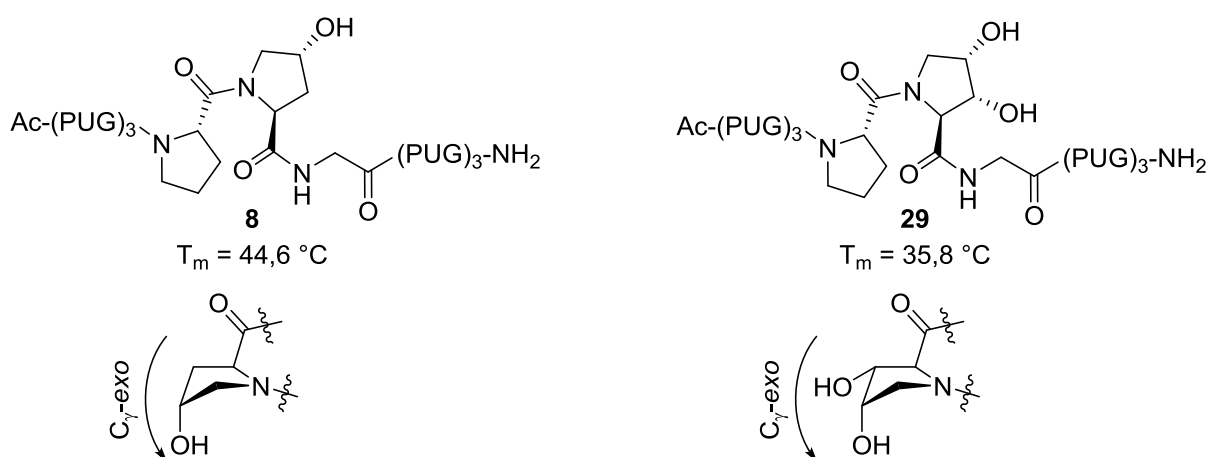


Abbildung 27: Vergleich zwischen den beiden hydroxylierten Kollagen-Modellpeptiden. **Links:** Prolin-Derivat **8** mit einer Schmelztemperatur von $44,6\text{ }^{\circ}\text{C}$. Der Pyrrolidinring liegt dabei in einer C_γ-*exo*-Konformation vor. **Rechts:** Dehydroprolin-Derivat **29** mit einer Schmelztemperatur von $35,8\text{ }^{\circ}\text{C}$. Der Pyrrolidinring zeigt dabei ebenfalls eine C_γ-*exo*-Konformation.

Allerdings liegt auch für Kollagen-Modellpeptid **29** der Schmelzpunkt mit $35,8\text{ }^{\circ}\text{C}$ deutlich unterhalb des Schmelzpunktes von **8** mit $44,6\text{ }^{\circ}\text{C}$. Allerdings fällt die Differenz mit $9,8\text{ }^{\circ}\text{C}$ deutlich geringer aus.^[83, 197] Diese Beobachtung zeigt deutlich die Wichtigkeit der Konformation des Pyrrolidinrings. Die durch den Hydroxysubstituenten in 4-Position induzierte C_γ-*exo*-Konformation ist also in der Lage, den extrem destabilisierenden Effekt eines Substituenten in 3-Position abzuschwächen.

Neben der Interpretation der Schmelztemperatur mittels der Konformation des Pyrrolidinrings in Yaa-Position, wird auch ein direkter Zusammenhang zwischen Schmelztemperatur der Tripelhelix und der Präferenz zur *cis*- oder *trans*-Amidbindung der jeweiligen Aminosäure diskutiert. Für Proline mit Substituenten in

4-Position lässt sich dabei eine Korrelation beobachten. Eine größere Tendenz zur *trans*-Amidbindung ist dabei in den meisten Fällen mit einer höheren Stabilität des entsprechenden Kollagen-Modellpeptides verbunden.^[32, 33, 54, 185, 233] Für Prolin-Derivate welche in 3-Position (beispielsweise 3-Hyp) oder in 3- und 4-Position Modifikationen aufweisen, lässt sich dieser Zusammenhang aufgrund der zusätzlichen sterischen Effekte jedoch nicht herstellen. Lediglich der Unterschied in der Schmelztemperatur zwischen Prolin-Derivat **32** und Dehydroprolin-Derivat **28** lässt sich noch mit der Präferenz zur *cis*- oder *trans*-Amidbindung korrelieren. Aber schon das Dihydroxyprolin-Derivat **29** sollte nach diesem Modell einen Schmelzpunkt im Bereich von **8** aufweisen, was experimentell nicht bestätigt werden konnte.^[61]

Der relative stabilisierende oder destabilisierende Effekt der verschiedenen Prolin-Konformationen bzw. Hydroxylierungen ist in Abbildung 28 noch einmal zusammengefasst.

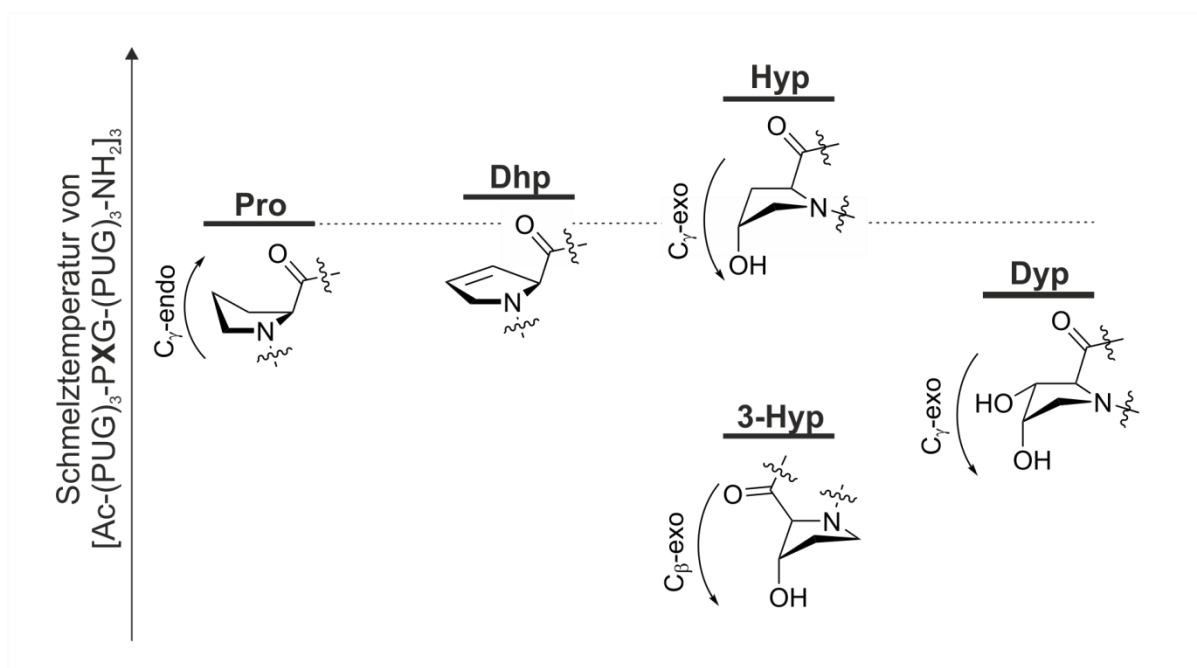


Abbildung 28: Schmelztemperaturvergleich der verschiedenen *host-guest* Kollagen-Modellpeptide. Dabei ist die relative Lage des Schmelzpunktes mit den jeweiligen Substitutionsmuster bzw. der Konformation des Pyrrolidin- oder Pyrrolinrings verknüpft. Prolin liegt dabei in der C_γ-endo, Hydroxyprolin und Dihydroxyprolin in der C_γ-exo und 3-Hydroxyprolin in der C_β-exo-Konformation vor. Einzig Dehydroprolin zeigt kein *puckering* des Pyrrolinrings.^[61, 83]

Mit der Untersuchung von Dihydroxyprolin in einem *host-guest* Kollagen-Modellpeptid ist der Satz der in 3- und 4-Position hydroxylierten Prolin-Derivate

vervollständigt und der Einfluss der Ringkonformation gegenüber der Substitution gezeigt.

3.1.8. Einfluss von Konformation und Polarität von Dihydroxyprolin auf die biologische Aktivität am Beispiel von Gramicidin S

Gramicidin S ist ein antimikrobielles Peptid welches von GAUSE und BRAZHNKOVA 1944 erstmals aus *Aneurinibacillus migulanus* (früher *Bacillus brevis*) isoliert werden konnte.^[271, 272] Es ist dabei ein zyklisches Decapeptid mit der Sequenz zyko(D-Phe-Pro-Val-Orn-Leu)₂. Dabei wird ein antiparalleles β -Faltblatt ausgebildet, bei dem die NH-Protonen des Valins und Leucins in intramolekularen Wasserstoffbrücken lokalisiert sind. Die Ornithine sind hingegen nicht in Wasserstoffbrücken involviert. Die antiparallele β -Faltblattstruktur wird an beiden Seiten durch einen Typ-II' β -turn der Aminosäuren D-Phe und Pro abgeschlossen. Daraus folgt für Gramicidin S eine C₂-symmetrische Struktur.^[273, 274] Die unpolaren Seitenketten der Valine und Leucine sind dabei in eine Richtung, die kationischen Seitenketten der Ornithine und die aromatischen Phenylringe des D-Phenylalanine hingegen in die andere orientiert, woraus ein amphiphiler Charakter der Gesamtstruktur resultiert. Diese Amphiphilie ist auch die Hauptursache für die antimikrobielle Wirkung von Gramicidin S. Dabei wird angenommen, dass es zuerst zu einer Wechselwirkung zwischen dem polaren Teil des Gramicidin S und dem polaren Teil der Lipidmembran kommt. Weiterhin kommt es zu einem Eindringen in die Membran und einer Wechselwirkung mit den Alkylketten der Lipide.^[274–277] Dies führt zu einer erhöhten Permeabilität der Membran und schlussendlich zum Zelltod. Gramicidin S zeigt dabei gegen eine Vielzahl von Gram-positiven sowie -negativen Bakterien antimikrobielle Wirksamkeit. Allerdings ist auch eine hohe hämolytische Wirkung bekannt, was Gramicidin S auf eine äußere, lokale Anwendung beschränkt.^[278–280] Dies macht Gramicidin S zu einer geeigneten Struktur, um durch Modifikationen eine hohe antimikrobielle Wirksamkeit bei gleichzeitiger Reduktion der hämolytischen Aktivität zu erreichen. So finden sich in der Literatur zahlreiche Modifikationen der Gramicidin S-Struktur. Diese reichen von Ringerweiterungen oder -kontraktionen,^[280–283] über Modifikationen des β -Faltblattes,^[284–286] hin zu Modifikationen der turn-Struktur.^[248, 283, 287–294] In Abbildung 29 sind einige Modifikationen des Prolins in der turn-Region dargestellt, wobei diese gegenüber der Modifikation der kompletten turn-Region eher selten beschrieben werden.

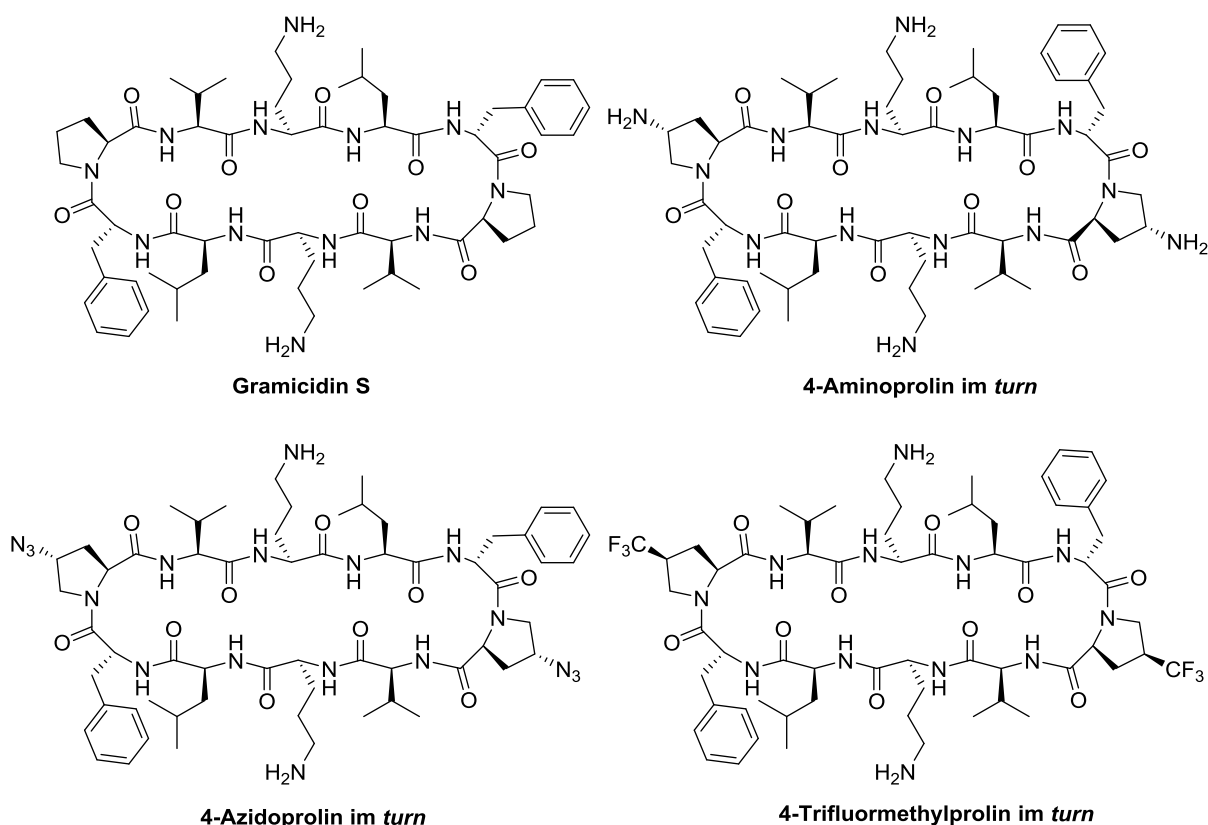


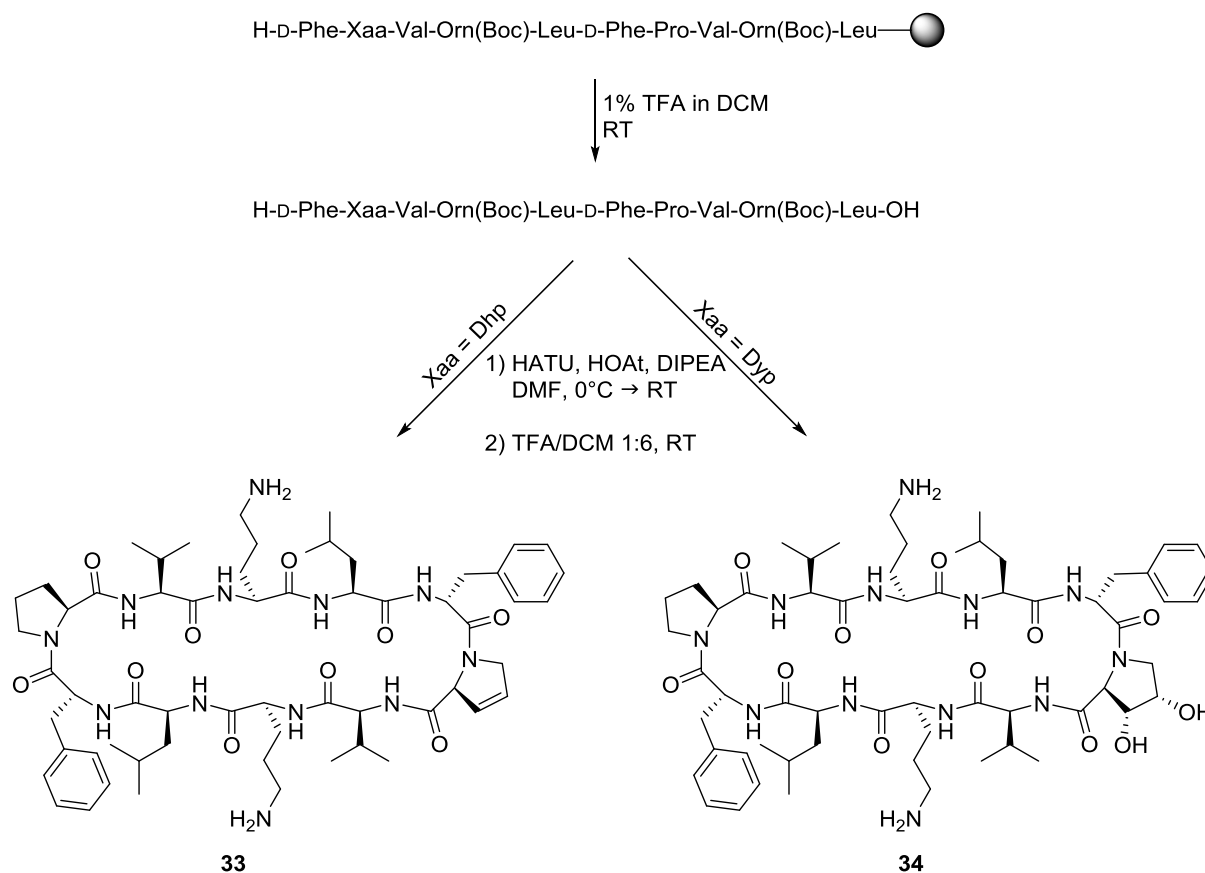
Abbildung 29: Struktur von Gramicidin S und einigen literaturbekannten Derivaten, die sich durch ein abweichendes Substitutionsmuster in der *turn*-Region auszeichnen.^[248, 295]

Gramicidin S stellt also durch die große Anzahl an Studien eine hervorragende Modellverbindung für eigene Studien dar. Daher wurde das Prolin eines *turns* gegen Dehydro- bzw. Dihydroxyprolin mutiert. Die Veränderung nur einer *turn*-Struktur hat dabei einen Bruch der C_2 -Symmetrie zur Folge, was eine deutlich detailliertere NMR-spektroskopische Untersuchung der Struktur zur Folge hat. Die biologische Aktivität der Gramicidin S-Derivate wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe ULRICH (Karlsruher Institut für Technologie) gegenüber verschiedenen Gram-positiven und -negativen Bakterienstämmen untersucht.

Die Synthese des linearen *Precursors* wurde mittels automatisierter Festphasenpeptidsynthese an 2-CTC-Harz durchgeführt, wobei die Sequenz so gewählt wurde, dass eine spätere Zyklisierung zwischen β -*turn* und β -Faltblatt, in diesem Fall zwischen den Aminosäuren Leucin und D-Phenylalanin, durchgeführt werden kann. Um die Boc-Schutzgruppe der Ornithine beim Abspalten des Peptidvorläufers vom Harz zu erhalten, wurde diese mit 1% TFA in DCM durchgeführt. Eine Zyklisierung ließ sich mittels HATU und HOAt als

Ergebnisse und Diskussion

Kupplungsreagenzien in DMF durchführen. Eine abschließende Entschützung und anschließende Reinigung mittels semipräparativer RP-HPLC lieferte schließlich das Dehydroprolin-Derivat **33** und das Dihydroxyprolin-Derivat **34** des Gramacidin S (Schema 16).



Schema 16: Synthese des Dehydroprolin-Derivats **33** und Dihydroxyprolin-Derivats **34** von Gramacidin S via Festphasenpeptidsynthese, Zyklisierung in Lösung und finaler Entschützung.^[224]

Während der Zyklisierung konnte allerdings schon ein Unterschied zwischen beiden Verbindungen beobachtet werden. Während die Umsetzung des linearen Vorläufers von **33** bereits nach 20 Stunden vollständig war, war die Reaktion zu **34** erst nach 5 Tagen vollständig, wobei nach 4 Tagen noch einmal HATU und HOAt zugegeben wurde. Dies deutet bereits auf eine unterschiedliche Präassemblierung der linearen Vorläufer hin. Ein deutlich unterschiedliches Verhältnis von *cis*- und *trans*-Isomer der D-Phe-Dyp-Amidbindung gegenüber der D-Phe-Dhp-Amidbindung stellt dabei die wahrscheinlichste Ursache dar.^[61, 257]

Ein Vergleich der CD-Spektren der Verbindungen **33** und **34** mit dem Spektrum von Gramacidin S sollte dabei erste Hinweise auf strukturelle Unterschiede oder

Ähnlichkeiten geben. Die Spektren wurden dabei in einer Konzentration von 100 μM zwischen 195 und 260 nm in MeOH aufgenommen (Abbildung 30).

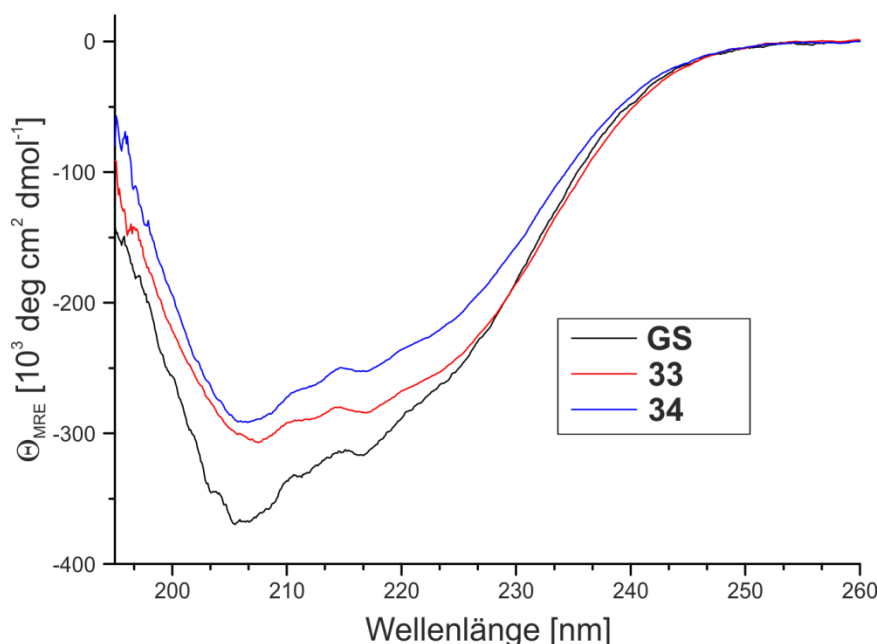


Abbildung 30: CD-Spektren von Verbindung **33** und **34** im Vergleich zu Gramicidin S in MeOH bei 27 °C und einer Konzentration von 100 μM .

Deutlich zu erkennen ist die, im Vergleich zu Gramicidin S, verringerte Intensität zwischen 200 und 230 nm. Die größten Intensitätsunterschiede sind für das Minimum bei 206 nm zu beobachten. Allerdings lässt sich durch den ähnlichen Verlauf der Kurven keine klare Aussage über etwaige strukturelle Änderung treffen. Eine substantielle Änderung der Konformation war aufgrund der geringen strukturellen Veränderungen des β -turns allerdings auch nicht zu erwarten. Deutlich detailliertere Strukturinformationen ließen sich allerdings durch eine NMR-spektroskopische Untersuchung gewinnen. Dabei gibt vor allem die Temperaturabhängigkeit der NH-Protonen einen ersten Hinweis auf mögliche Veränderung im β -turn oder der Struktur des β -Faltblattes. Dabei ließen sich allerdings keine Abweichung zum nativen Gramicidin S feststellen. Die NH-Protonen der Leucine und Valine hatten in allen Fällen eine geringe Temperaturabhängigkeit, die der Ornithine und D-Phenylalanine dagegen eine Hohe. Das weist darauf hin, dass von **33** und **34** eine zu Gramicidin S sehr ähnliche β -Faltblattstruktur eingenommen wird.^[296] Daher wurde nun die *turn*-Struktur genauer untersucht und vor allem die Konformation des Pyrrolidinrings betrachtet. Für die Proline ist eine C_8 -*endo*-Konformation bereits beschrieben.^[296] Der Dehydroprolinring in Verbindung

33 sollte dabei, wie in Kapitel 3.1.4. bereits beschrieben, planar sein. Jedoch sind für den Dihydroxyprolinring in **34** verschiedene Konformation denkbar, was eine genauere Konformationsanalyse notwendig macht. Dabei konnte für die 3J -Kopplung zwischen H_α und H_β des Dihydroxyprolins ein Wert von 0.8 Hz bestimmt werden, was einem Diederwinkel von etwa 90° entspricht. Dies ist insoweit erstaunlich, als das für die übliche C_γ -exo-Konformation ein Wert von etwa 6 Hz zu erwarten gewesen wäre.^[61] Die Kopplungskonstanten zwischen H_γ und H_δ mit 7.9 bzw. 8.3 Hz liegen auch deutlich höher. Zusammengenommen führt dies zu einer C_β -exo-Konformation des Pyrrolidinring, also einer Konformation, welche der von 3-Hydroxyprolin entspricht und für Dihydroxyprolin bisher nicht beschrieben wurde (Abbildung 31).

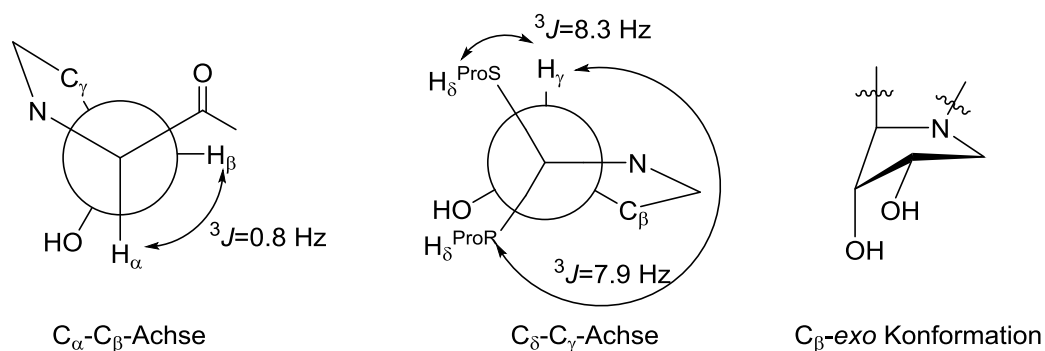


Abbildung 31: Konformationsanalyse des Pyrrolidinringes des Dihydroxyprolins aus **34**. **Links:** Rotamer entlang der C_α - C_β -Achse. Deutlich zu sehen ist der Winkel von 90° zwischen H_α und H_β . **Mitte:** Rotamer entlang der C_δ - C_γ -Achse. **Rechts:** C_β -exo-Konformation des Pyrrolidinrings des Dihydroxyprolins.^[224]

Da diese Konformation eingenommen wird, obwohl sie gegenüber der C_γ -exo, durch den Wegfall einer der beiden σ - σ^* -Wechselwirkungen (vgl. Kapitel 3.1.5.), energetisch ungünstiger sein sollte, muss also mit der Gesamtstruktur von Gramicidin S oder aber dem Einfluss der benachbarten Aminosäure zusammenhängen. Dabei scheint ein Einfluss der Seitenkette des Phenylalanins naheliegend da bereits mehrfach beschrieben ist, dass diese in Richtung des Pyrrolidinrings orientiert ist.^[296, 297] Sogar eine Wechselwirkung zwischen Pro- H_α und dem Phenylring des D-Phe ist beschrieben.^[298] Der ROE-Kontakt zwischen D-Phe- H_β und Dyp- H_δ , sowie der Kontakt zwischen den Protonen des Phenylrings und Dyp- H_α respektive Dyp- H_δ bestätigt ebenfalls die räumliche Nähe des Phenyl- und Pyrrolidinrings. Eine genaue Bestimmung des Seitenkettenrotamers von D-Phe war

hingegen aufgrund von Signalüberlappung bzw. fehlender Dispersion der H_β -Protonen nicht möglich.

Neben einer konformationellen Untersuchung der Peptide **33** und **34** wurde auch eine biologische Aktivität gegenüber verschiedenen Gram-negativen (*Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginosa*) und -positiven Bakterien (*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* und *Enterococcus faecalis*) untersucht. Die Bestimmung der minimalen Hemm-Konzentration (MHK) erfolgte dabei von Dr. BERDITSCH aus der Arbeitsgruppe ULRICH.^[277] Die MHK gibt dabei die minimale Konzentration an, bei der kein Bakterienwachstum mehr beobachtet werden kann. Außerdem wurde die hämolytische Aktivität (HC_{90}) der Verbindungen an menschlichem Blut bestimmt (Tabelle 11).

Tabelle 11: Minimale Hemm-Konzentration ($\mu\text{g/mL}$) gegenüber verschiedenen Bakterienstämmen und hämolytische Aktivität (HC_{90} , $\mu\text{g/mL}$) von Verbindungen **33**, **34** und nativem Gramicidin S.

	<i>E. coli</i> ^a	<i>P. aeruginosa</i> ^a	<i>S. epidermidis</i> ^b	<i>S. aureus</i> ^a	<i>E. faecalis</i> ^a	HC_{90}
GS	32	64	4	2	8	12
33	32	64	4	2	8	18
34	64	128	8	4	32	85

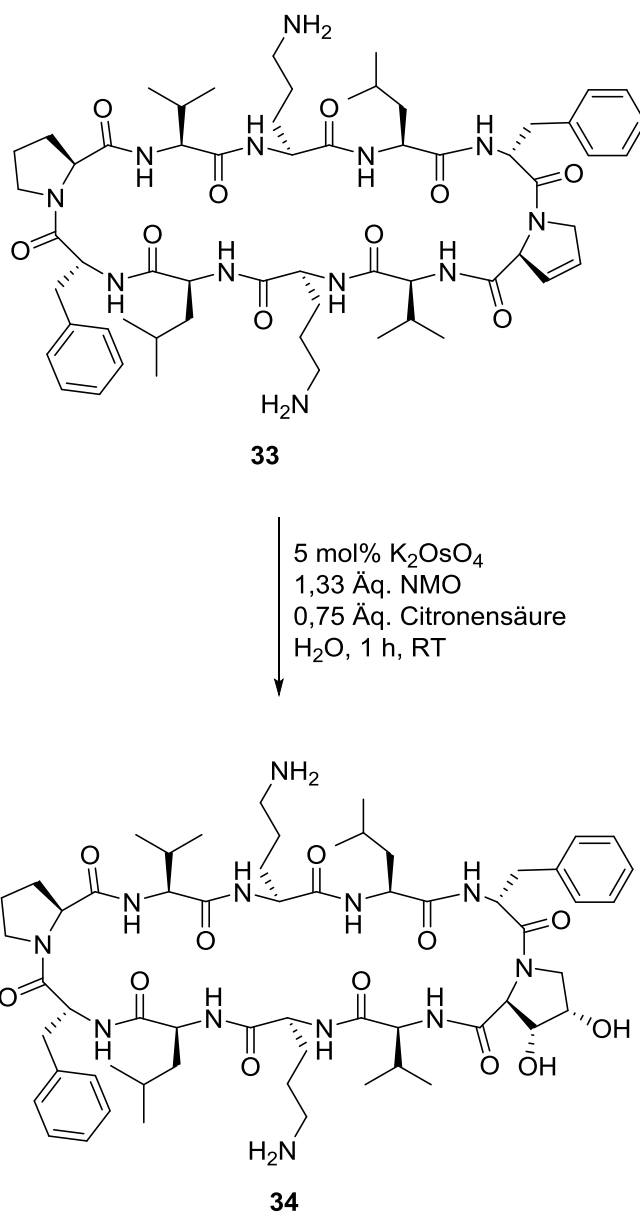
^aGram-negative Bakterien. ^bGram-positive Bakterien

Dabei fällt auf, dass sich die MHK-Werte von GS und dem Dehydroprolin-Derivat **33** nicht unterscheiden. Im Hinblick darauf, dass zwischen den beiden Strukturen, bis auf das *puckering* des Pyrrolidin- bzw. Pyrrolinrings, keine Strukturellen Unterschiede festgestellt werden konnten, überrascht diese Beobachtung nicht. Lediglich die hämolytische Aktivität von **33** ist mit einem HC_{90} -Wert von 18 $\mu\text{g/mL}$ leicht verringert. Ein deutlich größerer Unterschied ließ sich allerdings bei Dihydroxyprolin-Derivat **34** beobachten. Die MHK-Werte sind gegenüber nativem GS etwa doppelt so hoch, **34** besitzt also nur etwa 50% der Aktivität. Strukturell verwandte Zuckeraminosäuren im *turn* haben ebenfalls keinen Einfluss auf die Gesamtstruktur, jedoch weisen diese Derivate keine antimikrobielle Aktivität mehr auf.^[288, 299] Neben der verringerten antimikrobiellen Aktivität ist aber auch die hämolytische Aktivität mit einem HC_{90} -Wert von 85 $\mu\text{g/mL}$ deutlich verringert. Diese deutlich bessere, da verringerte, hämolytische Aktivität führt zusammen mit der

Abnahme der antimikrobiellen Aktivität jedoch zu einem verbesserten biologischen Profil im Gegensatz zum nativen GS.

3.1.9. *Late-stage* Dihydroxylierung am Beispiel eines Gramacidin S-Derivates

Um zu untersuchen, inwieweit sich die Methode einer *late-stage* Dihydroxylierung aus Kapitel 3.1.6. auf andere Peptidstrukturen übertragen lässt, bot sich eine Dihydroxylierung des Dehydroprolin-modifizierten Gramacidin S **33** an. So kann überprüft werden, ob sowohl die hohe Rigidität eines zyklischen Decapeptids, also auch die Anwesenheit von Seitenketten mit einer permanenten Ladung, in diesem Fall Ornithin, einen Einfluss auf die Reaktivität haben. Die Reaktion wurde dabei wie bei der Dihydroxylierung von Kollagen-Modellpeptiden in H₂O durchgeführt. Allerdings wurde mit 5 mol% Kaliumosmat die Katalysatorbeladung etwas niedriger gewählt (Schema 17).



Schema 17: Dihydroxylierung von Gramicidin S-Derivat **33** mit 5 mol% K_2OsO_4 , 1,33 Äq. NMO und 0,75 Äq. Citronensäure in H_2O .

Überraschenderweise wurde ein vollständiger Umsatz der Verbindung **33** bereits nach einer Stunde Reaktionszeit bei Raumtemperatur festgestellt. Eine solch kurze Reaktionszeit im Vergleich zu Kollagen-Modellpeptiden lässt sich dabei vor allem auf die rigide Struktur des Decapeptids und die Lokalisierung des Dehydroprolins im β -turn zurückführen, was die Doppelbindung für die Dihydroxylierung sehr gut zugänglich macht. Nach Reinigung mittels semipräparativer RP-HPLC konnte **34** in 83% Ausbeute erhalten werden. Ein zweites Diastereomer konnte wie auch bei der Umsetzung von Kollagen-Modellpeptiden nicht beobachtet werden. Um zu überprüfen, ob es sich hier um dasselbe Diastereomer wie in Kapitel 3.1.8. handelt wurden die 1H -NMR-Spektren der hier mittels Dihydroxylierung erhaltenen und der

via SPPS synthetisierten Verbindung verglichen und eine Übereinstimmung festgestellt. Dies war nötig, da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass der untere Halbraum des Dehydroprolins durch den Phenylring des D-Phe abgeschirmt wird und sich damit das andere Diastereomer bildet.

Es konnte hiermit gezeigt werden, dass die *late-stage* Dihydroxylierung zum Einführen eines Dihydroxyprolins in eine Peptidsequenz mit einem Dehydroprolin nicht nur auf Kollagen-Modellpeptide beschränkt ist. Eine Darstellung des Gramacidin S-Derivats **34** mit dieser Methode hat damit gegenüber der klassischen Synthese den Vorteil, dass nur einmal die Synthese des linearen Peptidvorläufers und eine Zyklisierung in Lösung durchgeführt werden muss und damit mit deutlich geringerem präperativem Aufwand verbunden ist.

3.2. Modifikationen der Kollagen-Tripelhelix durch *capping*

Gegenüber der Modifikation des Kollageneinzelstranges (Kapitel 3.1.) mit dem Ziel die Auswirkungen einer Veränderung auf die Tripelhelix zu untersuchen, wird hier versucht, die Eigenschaften einer tripelhelikale Struktur in seiner Gesamtheit zu modulieren. Dies geschieht, indem die Modifikationen des Einzelstranges nicht isoliert betrachtet werden, sondern in Wechselwirkung zueinander treten. In aller Regel wird dies mit einer Verknüpfung von Einzelsträngen realisiert. Dies kann kovalent oder nicht-kovalent erfolgen.^[29, 31, 84, 90, 102, 103] Um ein reversibles kovalentes *capping* der Kollagen-Tripelhelix zu erreichen, wurde die Eigenschaft von Boronsäuren ausgenutzt, Diol zu binden. Dabei ist Benzoboroxol (**35**), teilweise auch als Benzoxaborol bezeichnet, von besonderem Interesse, da es im Gegensatz zu anderen Boronsäure-Derivaten auch unter physiologischen Bedingungen sehr gute Eigenschaften der Diolbindung aufweist.^[123, 124, 133, 138] Ein schematischer Aufbau eines solchen *cappings* ist in Abbildung 32 zu sehen.

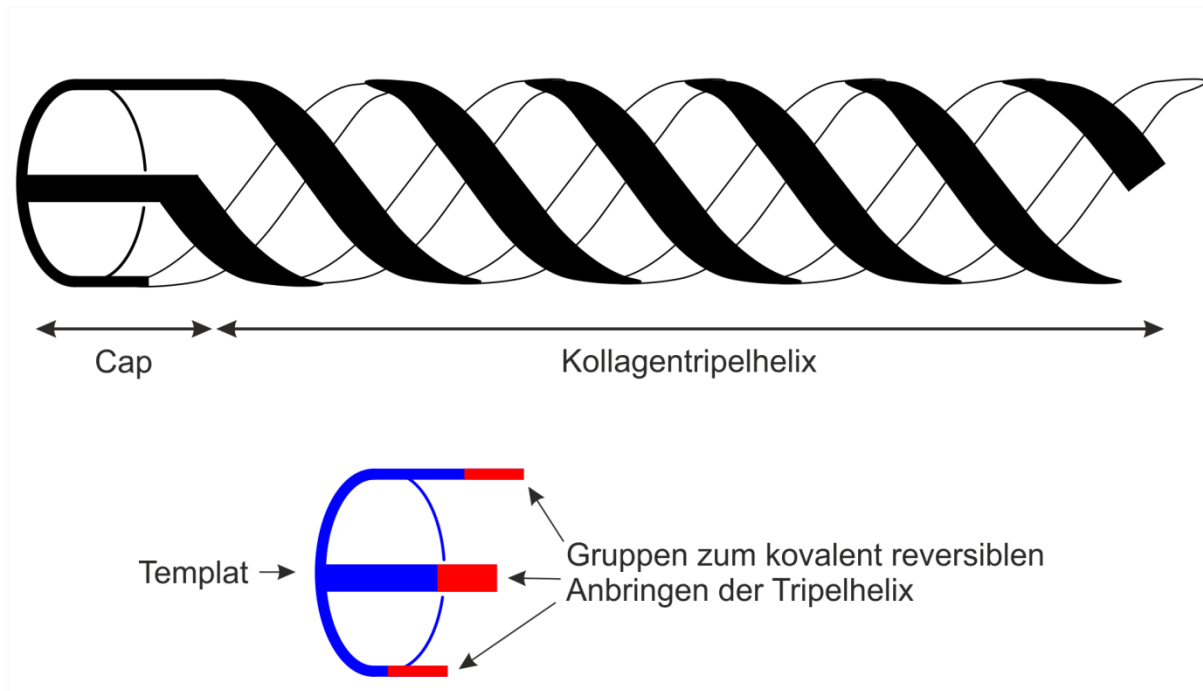


Abbildung 32: Schematische Darstellung einer Kollagen-Tripelhelix mit *cap*. Das *cap* lässt sich dabei in Templat als Grundstruktur (blau) und Gruppen zum kovalent reversiblen Binden der Tripelhelix (rot) unterteilen.

Das *cap* lässt sich dabei in zwei Teile zerlegen. Zum einen in das Templat (In Abbildung 32 in blau dargestellt), welches die Grundstruktur des *caps* darstellt. Sollte ein *cap* in der Tripelhelix entsprechendes Register aufweisen, so ist dieses Register auch im Templat vorhanden. Zum anderen in Gruppen, welche das kovalent reversible verknüpfen von Kollagen-Einzelsträngen ermöglichen (In Abbildung 32 in rot dargestellt), allerdings nicht zum Register beiträgt. Diese Gruppen müssen dabei nicht immer isoliert betrachtet werden, sondern können auch in Einzelfällen Teil des Templates sein.

3.2.1. Synthese eines Benzoboroxol-modifizierten Kollagen-Modellpeptids

Für die Synthese eines Benzoboroxol-modifizierten Kollagen-Modellpeptids mittels SPPS erscheint eine N-terminale Modifikation mit einem Benzoboroxol-Derivat als letzten Schritt der Assemblierung vom C- zum N-Terminus sinnvoll. In der Literatur sind sowohl amin-, als auch Carbonsäure-modifizierte Benzoboroxole bekannt (Abbildung 33).^[130, 132, 141, 157, 300–302]

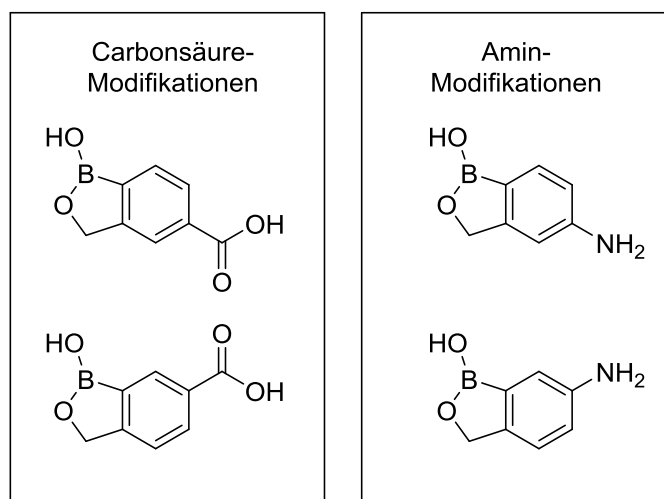
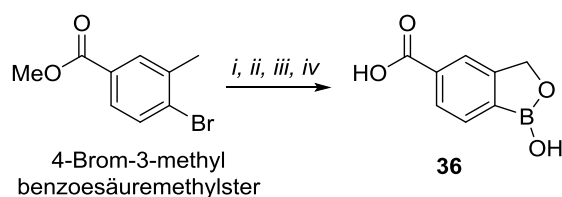


Abbildung 33: Verschiedene Benzoboroxol-Modifikationen. **Links:** Carbonsäure-Modifikationen in verschiedenen Positionen. **Rechts:** Amin-Modifikationen in verschiedenen Positionen.

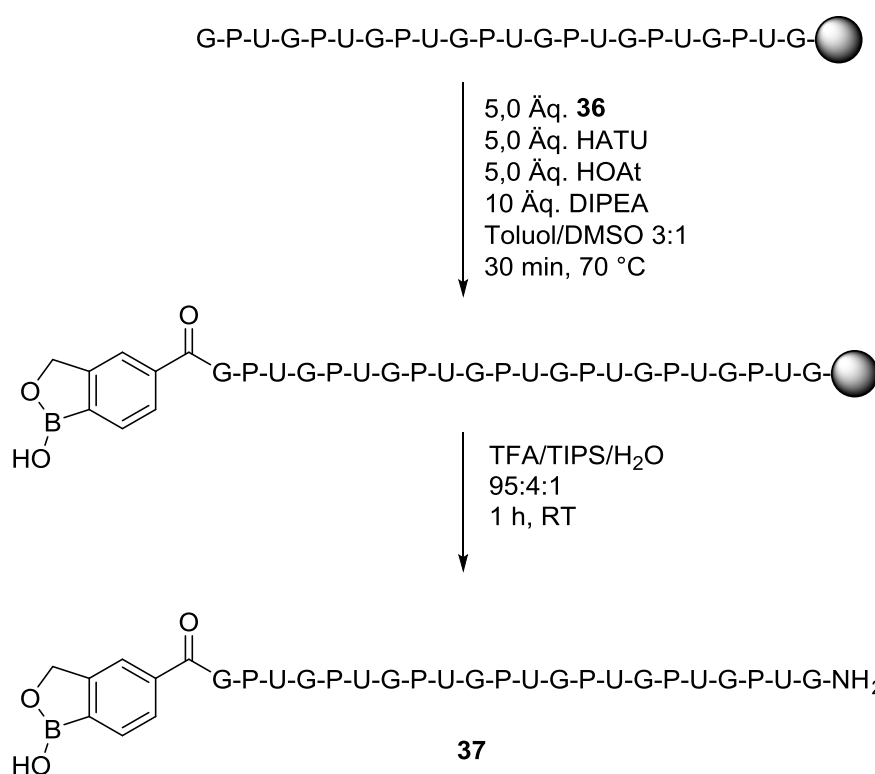
Für eine C-terminale Modifikation des Kollagen-Einzelstranges kommen allerdings nur Carbonsäure-modifizierte Derivate in Betracht, da eine abschließende Kupplung auf den entschützten N-Terminus in laufe der Festphasenpeptidesynthese möglich ist. Außerdem sollte die Bindung zum Diol, im Hinblick auf ein späteres *capping*, möglichst auf einer Achse mit der Peptidbindung liegen. Aus diesem Grund wurde das Derivat mit der Carbonsäure in *para*-Position zum Bor als geeignet erachtet. Dieses Derivat welches von WUTKE erstmals beschrieben wurde, konnte in einer 4-stufigen Synthese dargestellt werden (Schema 18).^[157, 303, 304]



Schema 18: Darstellung des Carbonsäure-modifizierten Benzoboroxol-Derivats **36**, ausgehend von 4-Brom-3-methylbenzoesäuremethylester in 4 Stufen.^[157, 303] (i) $\text{PdCl}_2(\text{dppf})$, $\text{B}_2(\text{pin})_2$, KOAc, DMSO, 80 °C; (ii) NBS, AIBN, MeCN, reflux; (iii) NaIO_4 , NH_4OAc , Aceton/ H_2O 1:1, RT; (iv) 15%ige KOH_{aq} , RT.

Für die Sequenz eines entsprechenden Kollagen-Modellpeptides wurden sieben PUG-Repetiereinheiten gewählt um eine gewisse Vergleichbarkeit mit anderen Peptiden zu gewährleisten. Allerdings wurde das Benzoboroxol-Derivat **36** nicht direkt am N-Terminus der (PUG)₇-Einheit, also am Prolin, sondern er wurde ein weiteres Glycin eingeführt bevor **36** abschließend auf den Einzelstrang gekuppelt wurde. Die N-terminale Verlängerung der Sequenz durch ein Glycin hat dabei vor allem den Zweck, einen Abstand zwischen Benzoboroxol und Tripelhelix zu schaffen und damit

ein „Ausfransen“ am Helixende durch ein kovalent reversibles *capping* zu verhindern was zu einer Destabilisierung der Gesamtstruktur führen kann. Die Verlängerung um ein Glycin führt allerdings nicht zur Entkopplung der Tripelhelix vom *cap* wie beispielsweise ein Ahx-spacer und kann daher als Sequenzkonformer *spacer* angesehen werden.^[86] Somit ergibt sich Borox-G-(PUG)₇-NH₂ (**37**) als Sequenz für ein Benzoboroxol-modifiziertes Kollagen-Modellpeptid welches, nach den in Kapitel 3.1.1. optimierten SPPS-Bedingungen, in 31% Gesamtausbeute dargestellt werden konnte (Schema 19). Dabei sei auch erwähnt, dass sich das Boroxol **36** unter den Bedingungen problemlos kuppeln ließ.



Schema 19: Darstellung des Benzoboroxol-modifizierten Kollagen-Modellpeptids **37** mittels SPPS. Dabei erfolgt erst die Kupplung von sieben PUG-Einheiten, bevor die Sequenz um ein Glycin verlängert wird und schließlich durch Kupplung des Bausteins **36** abgeschlossen wird. Eine Abspaltung vom polymeren Träger und Reinigung mittels semipräparativer RP-HPLC führt schließlich zum gewünschten Peptid **37**.

Bei einer NMR-spektroskopischen Untersuchung von **37** sollte geklärt werden, inwieweit die N-terminale Modifikation mit Boroxol-Derivat **36** und die Verlängerung der Sequenz mit einem Glycin, Einfluss auf die Struktur bzw. Schmelztemperatur der Tripelhelix hat. Bei näherer Betrachtung des ¹H-NMR-Spektrums fiel dabei zunächst auf, dass, im Vergleich zu Ac-(PUG)₇-NH₂ (**8**), zusätzliche aliphatische Signale beobachtet werden konnten (Abbildung 34)

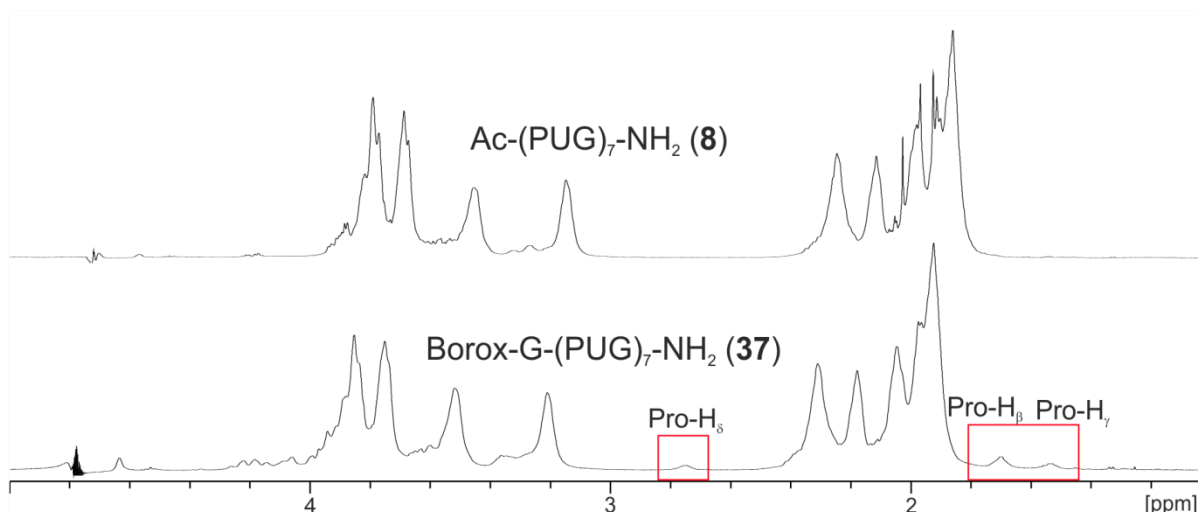


Abbildung 34: Ausschnitte aus den ¹H-NMR-Spektren (600 MHz, 300 K, 50 mM pH = 7,4 Phosphatpuffer/D₂O 9:1) der Kollagen-Modellpeptide **8** (oben) und **37** (unten). Die zusätzlichen Signale sind dabei im unteren Spektrum rot markiert.

Unter Zuhilfenahme des TOCSY-Spektrums ließ sich das Signale bei 1.54 und 1.70 ppm einem Pro-H_β bzw. Pro-H_γ und das Signal bei 2.75 ppm einem Pro-H_δ zuordnen. Eine Auswertung der ¹H-NMR-Spektren bei verschiedenen Temperaturen ergab zudem, dass es sich um Signale exakt eines Prolins der tripelhelikalen Spezies handelt. Eine Auswertung des NOESY-Spektrums ergab zudem, dass es sich um ein N-terminales Prolin handeln muss, da ein Kreuzsignal zu aromatischen Protonen des Benzoboroxols beobachtet werden konnte. Dies lässt den Schluss zu, dass Signale zum N-terminalen Prolin des *leading strand* gehören und durch einen Ringstromeffekt des benachbarten Benzoboroxols des *lagging strand* eine Verschiebung in Richtung Hochfeld erfahren.

Mittels ¹H-NMR-basierter Bestimmung (Kap. 3.1.2.) konnte für **37** ein Schmelzpunkt von 48,2 °C ermittelt werden. Anhand dieser Verbindung ließ sich auch erstmal eine direkte Bestimmung der ungefalteten Spezies durchführen. Dazu wurde sich zunutze gemacht, dass die aromatischen Protonen der Benzoboroxol-Funktion im gefalteten und ungefalteten Zustand eine ausreichende Signaldispersion aufwiesen. Durch die gleichzeitige Beobachtung von tripelhelikal gefalteter und ungefalteter Spezies konnte auch noch einmal die Gültigkeit des Zwei-Zustands-Modells für diese Verbindungsklasse gezeigt werden (Abbildung 35).

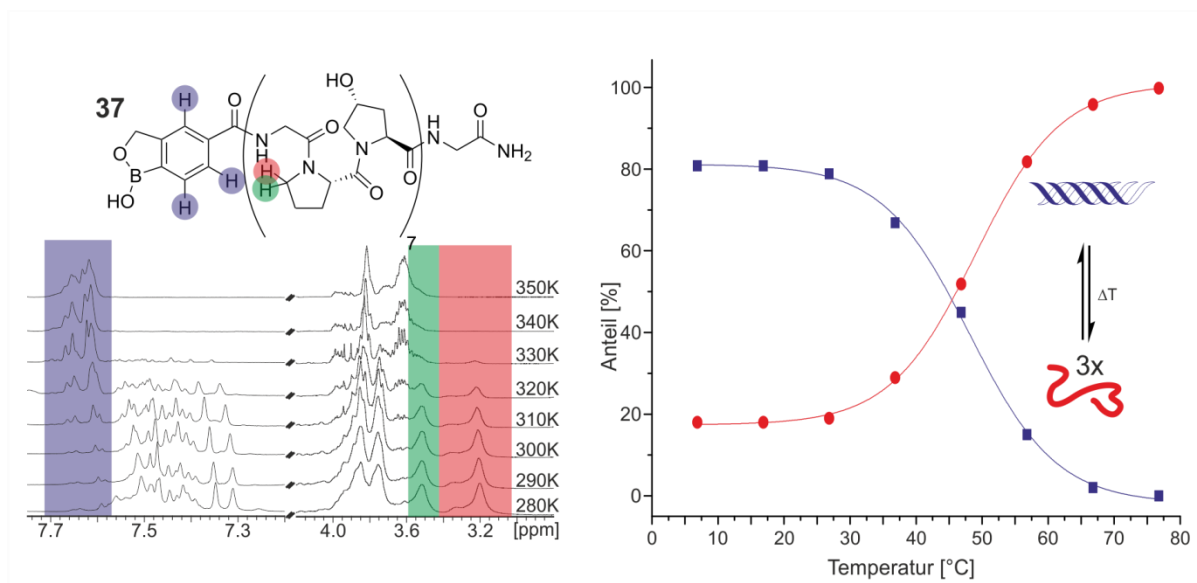


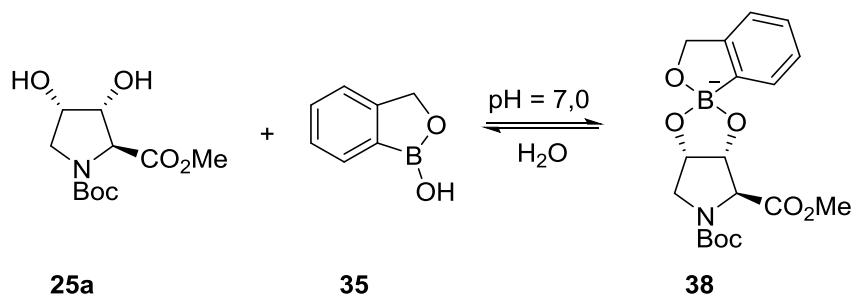
Abbildung 35: Bestimmung der Schmelztemperatur von **37**. **Links:** ¹H-NMR-Spektren (500 MHz, 50 mm, pH = 7,4 Phosphatpuffer/D₂O 9:1) von 280 bis 350 K in 10 K-Schritten. In blau sind die Signale der aromatischen Protonen zu erkennen, anhand derer die Quantifizierung des Einzelstrangs durchgeführt wurde. In rot sind die Signale der Pro-δ-Protonen zu sehen, anhand derer der Anteil einer tripelhelikalen Spezies durchgeführt wurde. **Rechts:** Anteil der tripelhelikalen Spezies (blau) bzw. des Einzelstrangs (rot) von **37** in Abhängigkeit der Temperatur. Der sigmoidale Kurvenverlauf ist durch die blaue bzw. rote Linie dargestellt.

Eine Bestimmung des Schmelzpunktes anhand des Einzelstranges führt dabei ebenfalls zu einem Wert von 48,2 °C, was durch den inversen Kurvenverlauf allerdings zu erwarten war. Der Schmelzpunkt liegt mit 48,2 °C für **37** auch 3,6 °C höher als der Schmelzpunkt von Ac-(PUG)₇-NH₂ (**8**). Dieser erhöhte Schmelzpunkt lässt sich dabei vor allem durch die N-terminale Verlängerung um eine Aminosäure erklären und liegt dabei bei etwa einem Drittel der Stabilisierung einer Pro-Hyp-Gly-Repetiereinheit.^[62, 305] Ein destabilisierender Effekt durch das Benzoboroxol kann also nicht beobachtet werden, obwohl bereits beschrieben ist, dass terminale, aromatische Rest einen destabilisierenden Effekt haben.^[306]

3.2.2. Wahl einer geeigneten 1,2-Diolstruktur zum kovalent reversiblen *capping*

Als Ausgangspunkt für die Suche nach einer geeigneten 1,2-Diolstruktur für das kovalent reversible *capping* von **37** wurde Boc-Dyp-OMe (**25a**) als Modelldiol untersucht, um die Eignung von Dihydroxyprolin für die Bindung von Benzoboroxol (**35**) zu untersuchen (Schema 20). Dabei ist der Umsatz zur entsprechenden gebundenen Spezies **38** bei einem 1:1 Verhältnis zwischen Benzoboroxol (**35**) und Diol **25a** der entscheidende Parameter.

Ergebnisse und Diskussion



Schema 20: Veresterung von Boc-Dyp-OMe (**25a**) und Benzoboroxol (**35**) zum Boronat **38** in 50 mM Kaliumphosphatpuffer bei pH = 7,0.

Dabei sind zwei verschiedene Diastereomere für das Boronat **38** möglich, jedoch konnte nur ein Diastereomer beobachtet werden. Eine genaue Bestimmung war allerdings aufgrund fehlender NOE-Kontakte zwischen Protonen des Pyrrolidinrings und des Aromaten nicht möglich. Dies legt aber den Schluss nahe, dass der aromatische Ring vom Pyrrolidinring weg orientiert ist. Nun wurde die Menge an **35** schrittweise erhöht und der Umsatz zum Boronat **38** NMR-spektroskopisch untersucht. Dabei konnte beobachtet werden, dass das Gleichgewicht bei weitem nicht vollständig auf der Seite des Boronats **38** lag und auch durch einen Überschuss Benzoboroxol (**35**) der Umsatz zu **38** nicht über 60% gesteigert werden konnte (Abbildung 36).

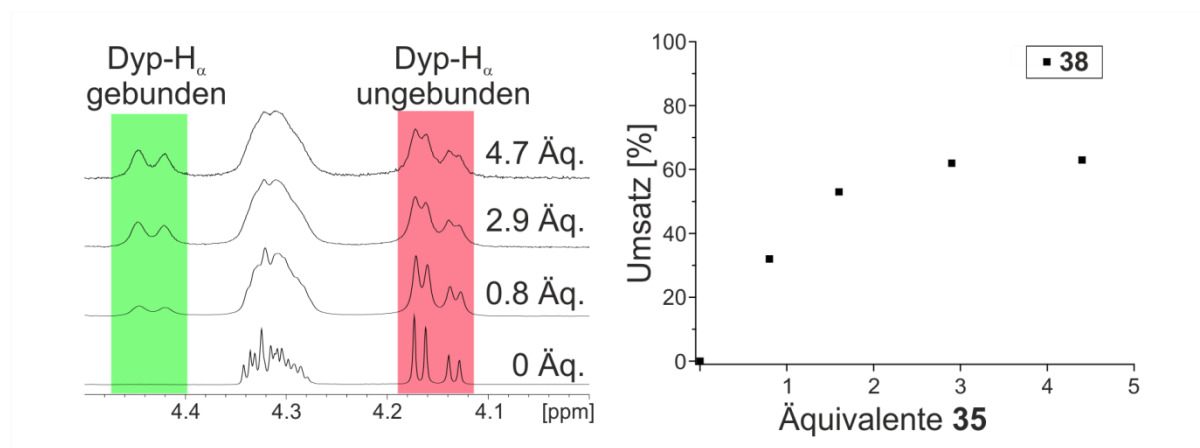


Abbildung 36: Veresterung von Boc-Dyp-OMe (**25a**) mit Benzoboroxol (**35**) zum Boronat **38**. **Links:** Ausschnitte aus den ^1H -NMR-Spektren der Titrationsreihe. Die Dyp- H_α -Protonen der ungebundenen Spezies sind dabei rot, die der gebundenen grün hinterlegt. Der doppelte Signalsatz ist dabei auf *cis-trans*-Isomerie des Carbamats zurückzuführen. **Rechts:** Umsatz zu **38** in Abhängigkeit der zugesetzten Menge Benzoboroxol (**35**).

Weiterhin konnte beobachtet werden, dass mit der Bindung von Benzoboroxol (**35**) der Pyrrolidinring seine Konformation ändern muss. Während **25a** in einer $\text{C}_\gamma\text{-exo}$ -Konformation vorliegt (vgl. Kapitel 3.1.5.), ist diese Konformation für das Boronat **38** nicht zu beobachten, was sich bereits an der fehlenden 3J -Kopplungskonstante

zwischen H_α und H_β der gebundenen Spezies **38** festmachen lässt. Eine C_β -exo-Konformation, welche auch im Gramacidin S-Derivat **34** eingenommen wird, erscheint daher wahrscheinlich. Die energieminierte Struktur von Boronat **38** weist ebenfalls eine C_β -exo Konformation auf (Abbildung 37).

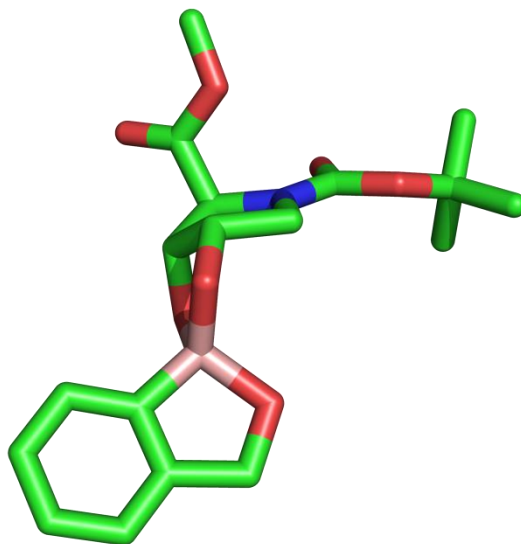


Abbildung 37: Energieminimierte Struktur aus der Moleküldynamiksimulation von **38**. Kohlenstoffatome sind in grün, Stickstoffatome in blau, Sauerstoffatome in rot und Boratome in pink dargestellt. Auf die Darstellung der Wasserstoffatome wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet. Deutlich zu erkennen ist die C_β -exo-Konformation des Pyrrolidinrings.

Diese Konformationsänderung könnte ein Grund für das stagnieren der Umsatzkurve sein. Die C_β -exo-Konformation sollte gegenüber der C_γ -exo-Konformation ungünstiger sein (vgl. Kapitel 3.1.8.). Jedoch gilt es zu beachten, dass auch das Nutzen von verschiedenen Zuckern oder anderen Diolen zu keinen vollständigen Umsatz zum Boronat führen.^[125, 129, 133, 156] Da für das *capping* der Kollagen-Tripelhelix allerdings drei dieser Boronate, also eins pro Einzelstrang, notwendig sind, ist ein Umsatz von 40% bei einem 1:1 Verhältnis nicht ausreichend. Ein Umsatz von 40% pro Diol würde bezogen auf die Tripelhelix zu einem *capping* von durchschnittlich 6% führen. Dihydroxyprolin eignet sich daher nicht als Diol für das kovalent reversible *capping* von Kollagen-Modellpeptiden.

Ein von WUTTKE entwickeltes Diol mit sehr guten Bindungseigenschaften kam durch seine große Rigidität und sterischen Anspruch allerdings auch nicht für das *capping* von Kollagen-Modellpeptiden infrage.^[156]

Weitaus vielversprechender schien die Nutzung von strukturell deutlich weniger komplexen Diolen. Dabei sind vor allem aromatische 1,2-Diole, also Catechole bzw. davon abgeleitete Derivate, von besonderem Interesse. Es konnte bereits gezeigt werden konnte, dass diese in Vergleich zu aliphatischen 1,2-Diolen oft über deutlich bessere Eigenschaften zur Bindung von Boronsäuren verfügen.^[147, 152, 307–309] Für eine NMR-spektroskopische Untersuchung der Bindung zu Benzoboroxol (**35**) wurde 3,4-Dihydroxybenzoesäuremethylester (**39**) verwendet, da zum einen elektronenarme Catechol-Derivate deutliche bessere Bindungseigenschaften aufweisen und dieses Derivat zum anderen als Carbonsäure prinzipiell mit der SPPS kompatibel sein sollte.^[307, 308] Die Konzentration wurde dabei mit 3 mM in pH = 7,4 Phosphatpuffer gewählt, da dies auch den Bedingungen eines späteren *cappings* von Kollagen-Modellpeptiden entsprechen würde. Der Umsatz zum entsprechenden Boronat **40** lag hier bei 80% (Abbildung 38).

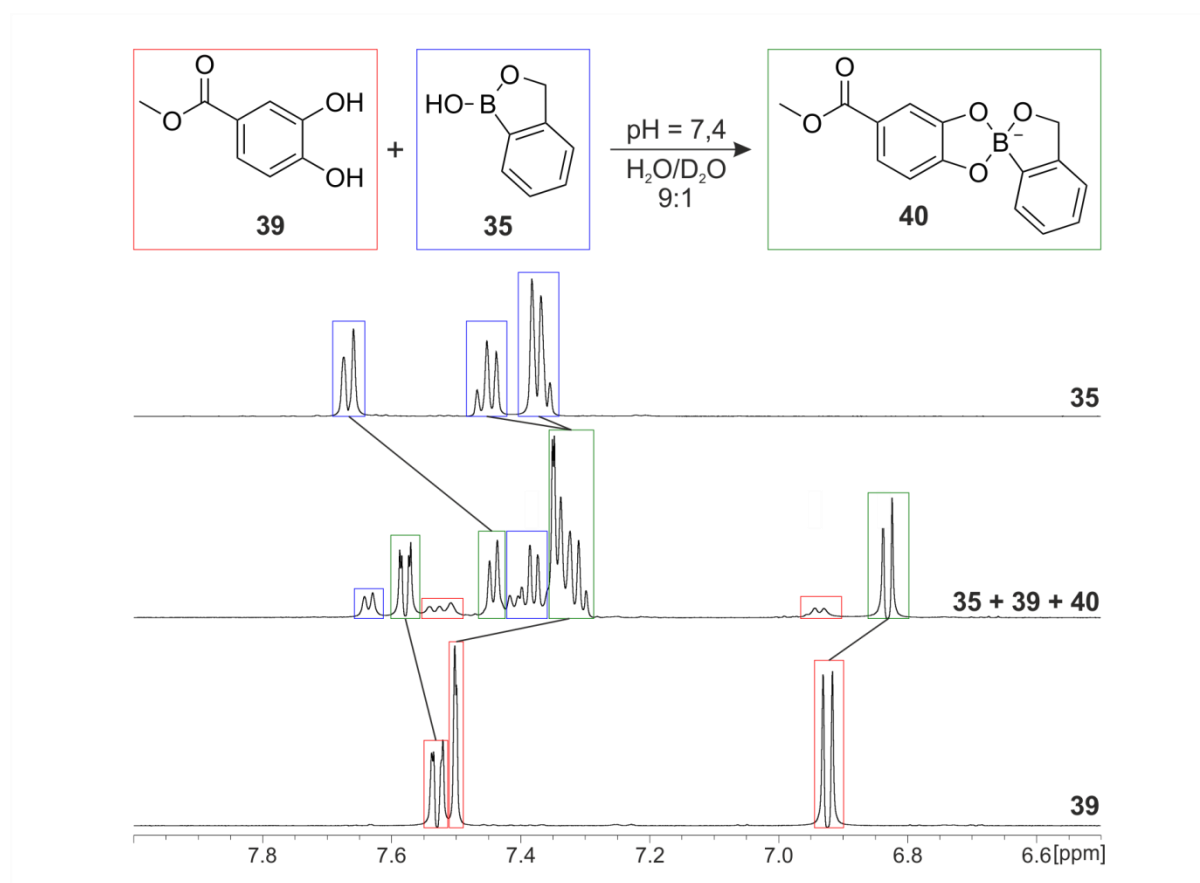


Abbildung 38: Bildung des Boronat **40** aus Benzoboroxol (**35**) und 3,4-Dihydroxybenzoesäuremethylester (**39**). Es ergab sich ein Umsatz von 80% zum Boronat **40** in einer 3 mM Lösung. Die jeweiligen Signale in den ¹H-NMR-Spektren (600 MHz, 300 K, pH = 7,4 Phosphatpuffer/D₂O 9:1) von **35**, **39** und der entsprechenden 1:1 Mischung sind dabei farbig markiert. Das Diol **39** in rot, das Benzoboroxol (**35**) blau und das gebildete Boronat **40** in grün. Aus der Integration des Signals bei 6.8 ppm ergibt sich ein Umsatz von 80%.

Es ist deutlich zu erkennen, dass die Signaldispersion der aromatischen Protonen des Benzoboroxols (**35**) im gebundenen Zustand abnimmt und sich in Richtung Hochfeld verschiebt. Außerdem ändert sich auch leicht die chemische Verschiebung der aromatischen Protonen im ungebundenen Zustand, wobei dies auf minimale Änderungen des pH-Wertes zurückgeführt werden kann.^[157] Mit 80% Umsatz zum Boronat bei einer äquimolaren Mischung zwischen einem Boroxol- und einem 1,2-Diol-Derivat in wässriger Lösung konnte der bisher beste Wert erreicht werden. Das Catechol-Strukturmotiv scheint für die Entwicklung einer Verbindung mit drei 1,2-Dioleinheiten für das kovalent reversible *capping* am vielversprechendsten.

3.2.3. Struktur möglicher *caps* und deren Synthese

Wie in Kapitel 3.2.2. bereits beschrieben, eignet ist das Catechol-Strukturmotiv zum effektiven Binden von Benzoboroxolen. An ein entsprechendes *cap* stellen sich allerdings eine Reihe weiterer Anforderungen. Zum einen muss ein solches *cap* drei dieser Catechol-Funktionalitäten aufweisen. Zum anderen müssen diese drei Dirole eine Bindung ermöglichen welche dem Register eines Kollagen-Modellpeptides entspricht. Das heißt, es muss in der Lage sein, *leading*, *middle* und *lagging strand* zu binden, was hohe Anforderungen an die Struktur eines solchen *caps* darstellt. Außerdem soll das *cap* eine möglichst geringe molekulare Masse aufweisen um den Unterschied zur Tripelhelix ohne *cap* möglichst klein zu halten. Als letzte Anforderung ergibt sich die notwendige Wasserlöslichkeit.

Als erste mögliche Struktur für ein solches *cap*, in welchem die Gruppen zum kovalent reversiblen Binden von Boroxolen direkt im Templat integriert sind, stellte sich Zyklocatechylen (**41**) heraus. Die Verbindung besitzt drei Catechol-Funktionalitäten und ist dabei leicht aus Formaldehyd und Veratrol zugänglich (Abbildung 39). Außerdem konnte sie bereits in der Assemblierung tripelhelikaler Strukturen eingesetzt werden, welche mit der von Kollagenen allerdings nicht vergleichbar ist.^[310, 311]

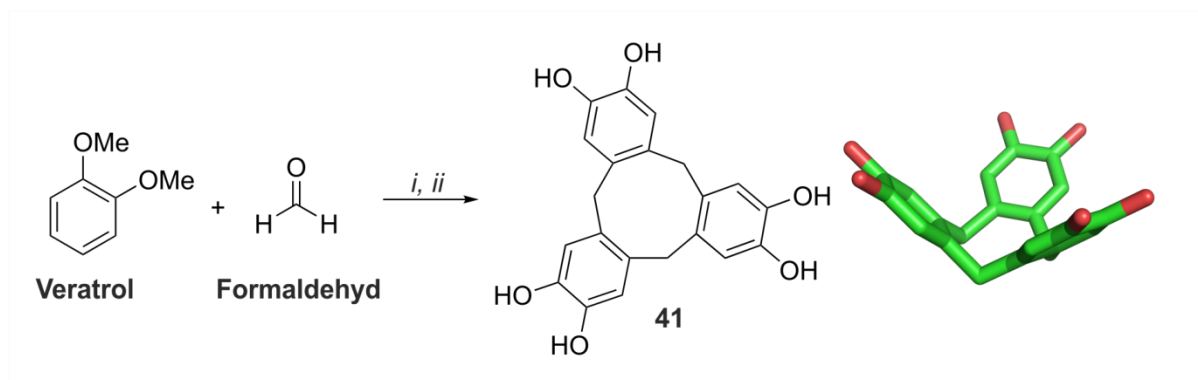
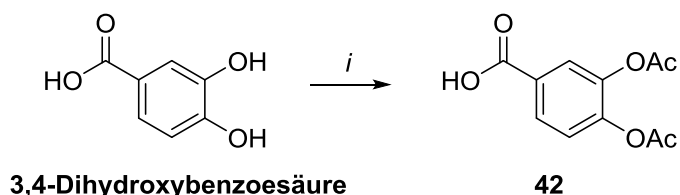


Abbildung 39: Links: Synthese von Zyklocatechylen (**41**). (i) Konz. HCl, 60 °C→RT, 18 h; (ii) BBr₃, DCM, 0 °C→RT, 5 h. **Rechts:** Energieminimierte Struktur von **41**.

Zyklocatechylen (**41**) nimmt dabei eine schüsselartige Struktur mit C_3 -Symmetrie ein. Das Verbindungen mit dieser Symmetrie in der Lage sind, das Register eines Kollagen Peptides durch Verkippen gegenüber der Achse der Tripelhelix auszugleichen, konnte von GOODMAN bereits gezeigt werden.^[212, 305] Im Laufe weiterer Untersuchungen stellte sich allerdings heraus, dass die Löslichkeit in Wasser zu gering war um weitere Tests zur Boronsäureveresterung durchzuführen. Zyklocatechylen (**41**) ist also als *cap* für Kollagen-Modellpeptide ungeeignet.

Aufgrund der begrenzten Löslichkeit vieler Catecholstrukturen wurde nun versucht eine Peptidstruktur zu finden, welche den oben genannten Anforderungen entspricht. Das hat zum einen den Vorteil, dass Peptide in der Regel gut in Wasser löslich sind und zum anderen lassen sich Peptidsequenzen deutlich einfacher, den Anforderungen entsprechend, modifizieren.

Zu aller erst wurde versucht einen zur Festphasenpeptidsynthese kompatiblen Baustein mit Catechol-Strukturmotiv zu finden. Dabei erwies sich 3,4-Diacetoxybenzoesäure (**42**) als vielversprechender Baustein, welcher in der Literatur noch nicht in der SPPS eingesetzt wurde (Schema 21).^[312]



Schema 21: Synthese von 3,4-Diacetoxybenzoesäure (**42**). (i) Ac₂O, DIPEA, DCM, 1 h, RT.

Um zu untersuchen, ob sich der Baustein **42** unter den üblichen Bedingungen in der SPPS einsetzen ließ, wurde die Kupplung auf ein Testpeptid mit der Sequenz Ala-

Leu-Gly mit anschließender Freisetzung der Dihydroxyfunktion untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass die Verwendung von DIC und Oxyma als Kupplungsreagenzien bei erhöhter Temperatur zu den besten Ergebnissen führte, während eine Kupplung unter Verwendung von HBTU, HOBT und DIPEA nicht vollständig ablief.

Mit einem Baustein, welcher die Synthese von Peptiden mit Catechol-Struktureinheit ermöglichte, musste nun eine geeignete Peptidstruktur, welche sich als Templat eignet, gefunden werden. Dabei sind vor allem zyklische Hexapeptide zu erwähnen, welche sich strukturell sehr gut modifizieren lassen. Von besonderem Interesse ist dabei $\text{zyk}(\text{Lys-Gly})_3$ welches bereits bei der Trimerisierung von A_β -Peptiden erfolgreich genutzt wurde.^[313] Diese Leitstruktur wurde durch eine Veränderung der Länge der Lysin-Seitenketten modifiziert um dem Register der Kollageneinzelstränge Rechnung zu tragen. Zwar entspricht eine CH_2 -Gruppe nicht dem Versatz der verschiedenen Einzelstränge um eine Aminosäure, kann aber ein *capping* durchaus erleichtern. Diese Überlegungen führten zum in Abbildung 40 gezeigten zyklischen Hexapeptid **43** als Templat.

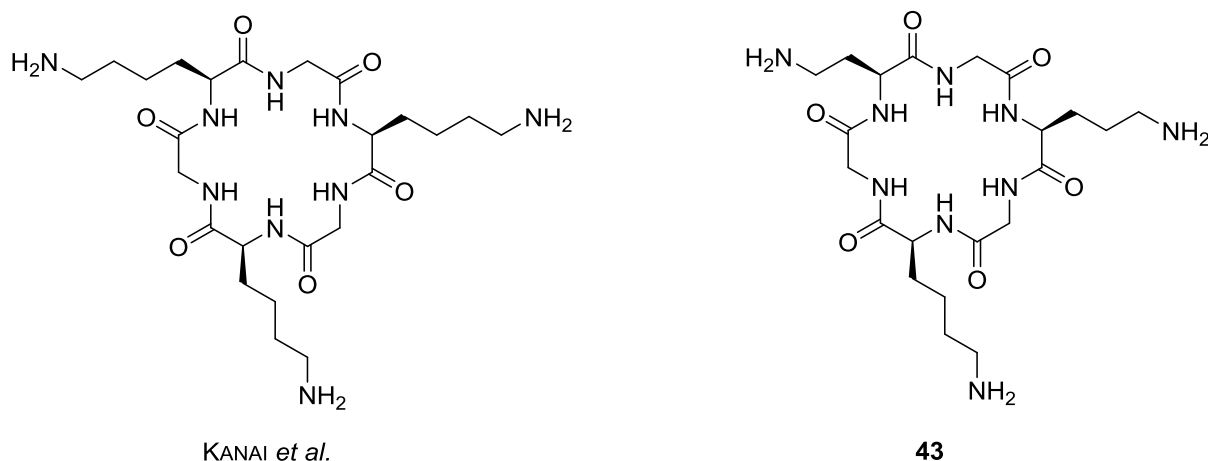
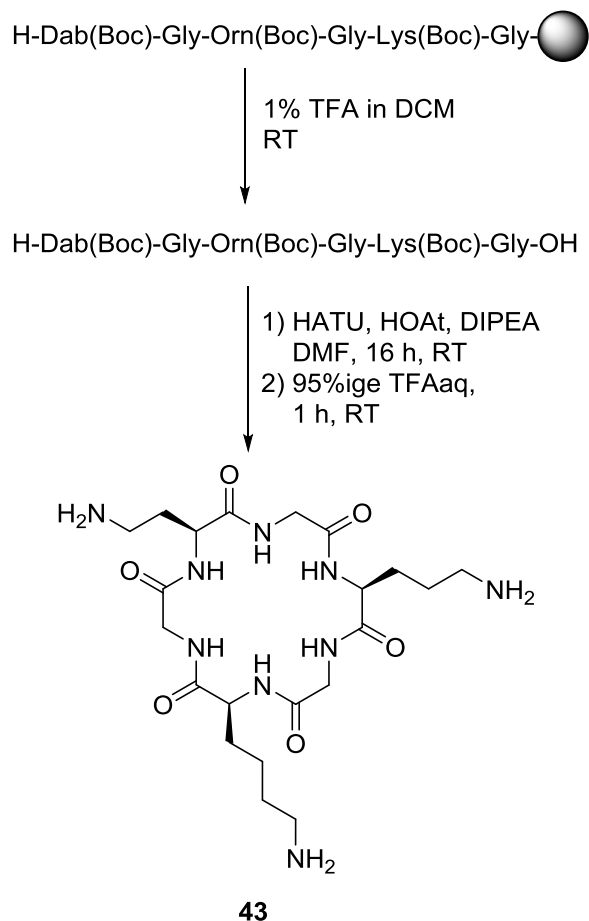


Abbildung 40: Von KANAI et al. eingesetztes Peptid zur Trimerisierung von A_β -Peptiden und daraus abgeleitetes Peptid **43**.^[313]

Dabei wurde zwei der drei Lysine gegen Ornithin und 1,4-Diaminobuttersäure (Dab) ausgetauscht. Dabei war auch darauf zu achten, dass die Verkürzung der Seitenketten um eine CH_2 -Einheit entgegen der Drehrichtung der Kollagenhelix erfolgt. Die Synthese des zyklischen Hexapeptids **43** erfolgte analog zur Synthese der Gramacidin S-Derivate (Kapitel 3.1.8.). Zuerst wurde der lineare Vorläufer am 2-

CTC-Harz aufgebaut und dann unter Erhalt der Seitenkettenschutzgruppen vom Harz abgespalten. Eine Zyklisierung in Lösung lieferte das seitenkettengeschützte Derivat welches im letzten Schritt zum Templat **43** entschützt werden konnte (Schema 22).



Schema 22: Synthese des zyklischen Hexapeptids **43**. Der lineare Vorläufer wurde mittels automatisierter Festphasenpeptidsynthese aufgebaut, unter Erhalt der Seitenkettenschutzgruppen vom 2-CTC-Harz abgespalten und in Lösung zyklisiert. Im abschließenden Schritt wurden die Seitenkettenschutzgruppen entfernt.

Es war außerdem möglich eine Konformationsanalyse des zyklischen Hexapeptids **43** in wässriger Lösung mittels NMR-Spektroskopie durchzuführen und damit eine Eignung als *cap* zu untersuchen. Dabei fiel vor allem auf, dass keinerlei NH-NH-ROE-Kontakte beobachtet werden konnten. Dies macht eine Struktur, bei der zwei Aminosäure durch je einen *turn* an jeder Seite eingefasst sind, unwahrscheinlich. Auch konnten generell nur ROE-Kontakte zwischen benachbarten Aminosäuren beobachtet werden. Eine Untersuchung der Temperaturabhängigkeit der NH-Protonen lieferte ebenfalls keine Hinweise auf eine definierte Strukturierung, da diese alle in einem Bereich von -5 bis -7 ppb/K lagen. Diese Beobachtung spricht

gegen intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen. Dies führt zu der Vermutung, dass das zyklische Hexapeptid **43** in wässriger Lösung eher eine Struktur einnimmt, welche sich als pseudo C_3 -symmetrisch beschreiben lässt (Abbildung 41). Solche Strukturen sind zwar selten, aber für eine ähnliche Verbindung bereits beschrieben worden.^[314]

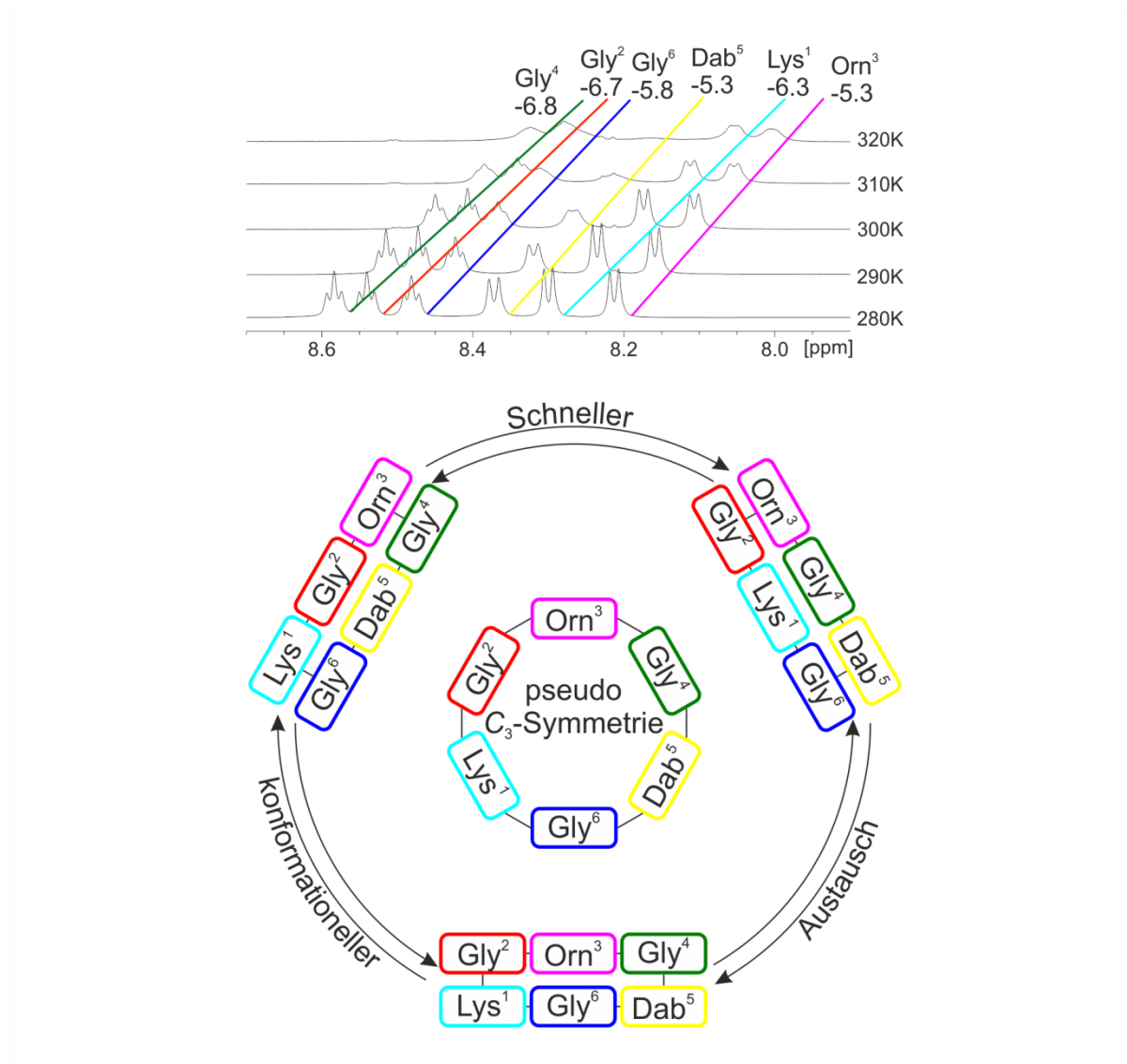


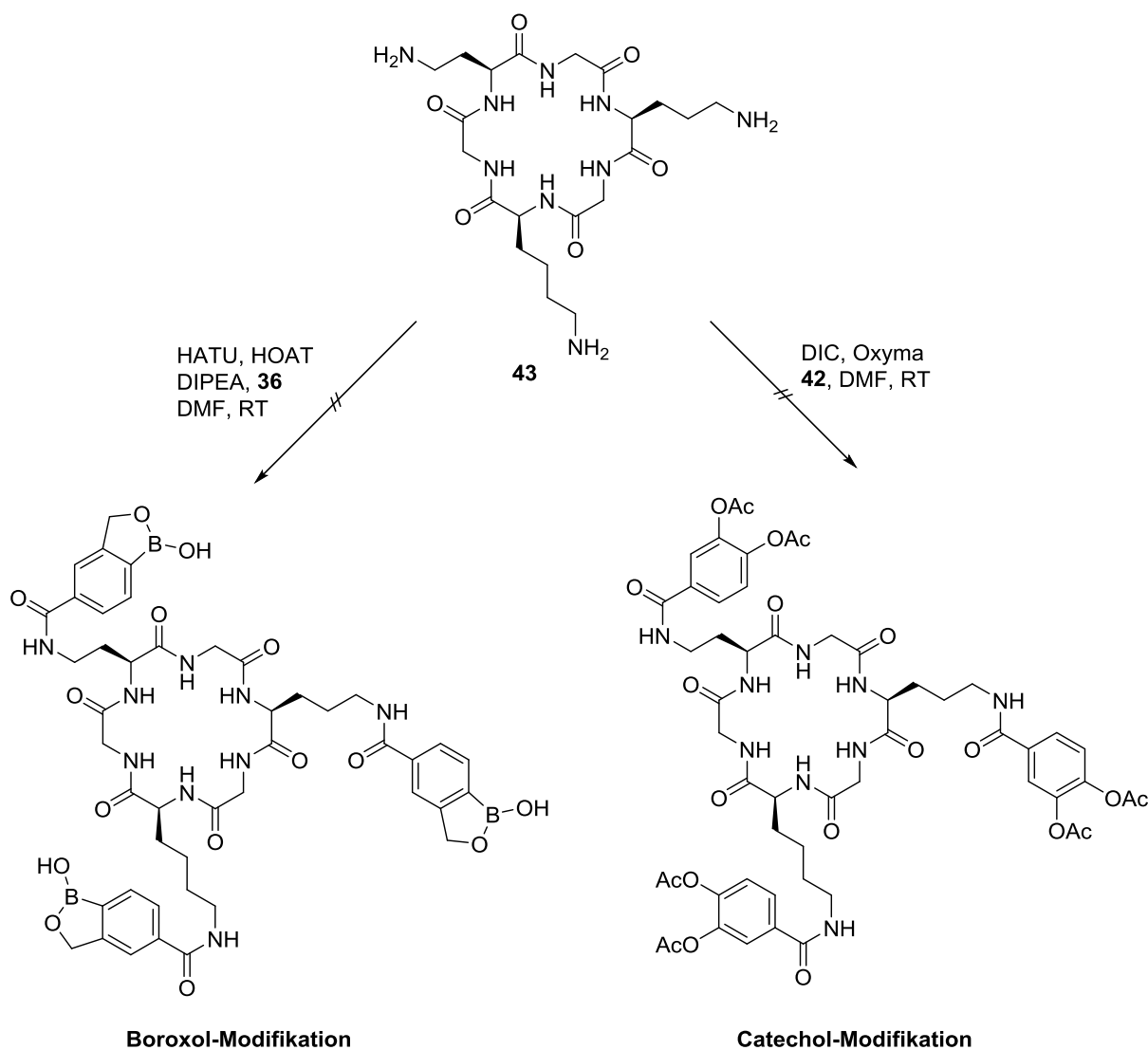
Abbildung 41: Oben: Ausschnitte aus den ^1H -NMR-Spektren bei verschiedenen Temperaturen der Verbindung **43** (600 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1). Eingezeichnet sind die Temperaturgradienten (in ppb/K) der verschiedenen NH-Protonen. Unten: Schematische Darstellung der pseudo C_3 -symmetrischen Struktur als Mittelung der drei verschiedenen *turn*-Strukturen in schnellen konformationellen Austausch.

Ein Grund für dieses Verhalten könnte sein, dass es bei einer Struktur mit zwei *turns* nicht möglich ist, dass beide $i+2$ -Positionen von Glycin besetzt sind. Dies führt dazu, dass es keine Struktur gibt, welche energetisch deutlich begünstigt ist und im ^1H -NMR-Spektrum nur ein gemitteltetes Signal aus den drei möglichen Strukturen, welche in schnellen konformationellen Austausch stehen, beobachtet werden kann.

Ergebnisse und Diskussion

Dafür spricht auch, dass die Temperaturabhängigkeit von lösungsmittlexponierten NH-Protonen oft deutlich kleiner als -6 bis -7 ppb/K sind.^[202, 314]

Nun wurde versucht, die Seitenketten von **43** mit 3,4-Diacetoxybenzoesäure (**42**) zu modifizieren. Diese Lösungssynthese führte allerdings nur zu komplexen Produktgemischen. Ebenso führte eine versuchte Modifizierung mit Boroxol-Derivat **36** nicht zum gewünschten Produkt (Schema 23).



Schema 23: Die versuchte Modifikation der Seitenketten von **43** mit **36** bzw. **42** führte in beiden Fällen zu komplexen Produktgemischen.

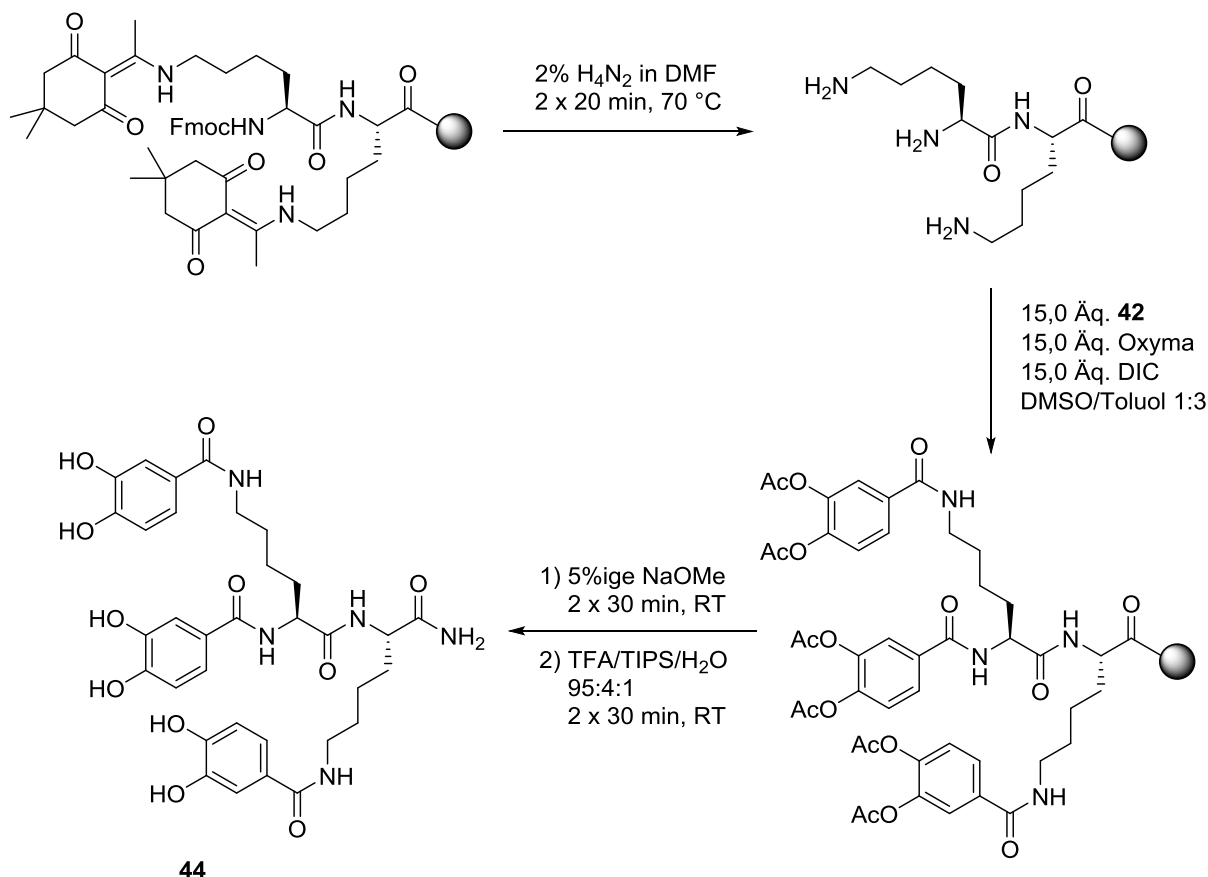
Ein Weiterführen dieses Ansatzes erschien im Hinblick auf die begrenzte Zugänglichkeit des zyklischen Hexapeptids **43** jedoch als nicht zielführend.

Ein Einführen von **42** als Seitenkettenmodifikation, sowie die Freisetzung der Catechol-Funktionalität noch auf der festen Phase würde dieses Problem zwar

lösen, wurde aber aufgrund der nachfolgenden Zyklisierung ebenfalls als wenig erfolgversprechend erachtet.

Deutlich einfach erschien daher, ein strukturell deutlich vereinfachtes Templat zu verwenden und auf der festen Phase zum *cap* zu modifizieren. Die Wahl fiel dabei auf ein Dipeptid aus Lysin bzw. Ornithin, welches sich an N-Terminus und an den Seitenketten modifizieren lässt und auch schon zum kovalent irreversiblen *capping* von Kollagen-Modellpeptiden verwendet wurde.^[87, 88, 196]

Für den Aufbau des Dipeptidtemplats wurde Fmoc-Lys(Dde)-OH verwendet. Die Seitenkettenschutzgruppe ließ sich dabei mit einer 2%iger Hydrazinlösung in DMF abspalten. Nun konnte 3,4-Diacetoxybenzoesäure (**42**) unter den bereits beschriebenen Bedingungen auf N-Terminus und Seitenketten gekuppelt werden. Die Behandlung mit 5%iger NaOMe in MeOH zum Freisetzen der Catechol-Funktionalität und TFA/TIPS/H₂O (95:4:1) zum Abspalten vom Rink-Amid-Harz lieferte schließlich das Lys-*cap* **44** (Schema 24).



Schema 24: Synthese des Lys-*caps* **44**. Die Entschützung der Seitenketten und des N-Terminus erfolgte mit 2%iger Hydrazin in DMF bei 70 °C. Anschließendes Kuppeln des Bausteins **42** unter optimierten Bedingungen, sowie die Behandlung mit 5%iger NaOMe in MeOH zum Freisetzen der Catechol-Funktionen und abschließender Abspaltung vom Rink-Amid-Harz mit TFA/TIPS/H₂O (95:4:1) lieferte das Lys-*cap* **44**.

Neben dem Lys-cap **44** waren aus Fmoc-D-Lys(Dde)-OH, Fmoc-Orn(Dde)-OH und Fmoc-D-Orn(ivDde)-OH die jeweiligen caps **45**, **46** und **47** zugänglich (Abbildung 42).

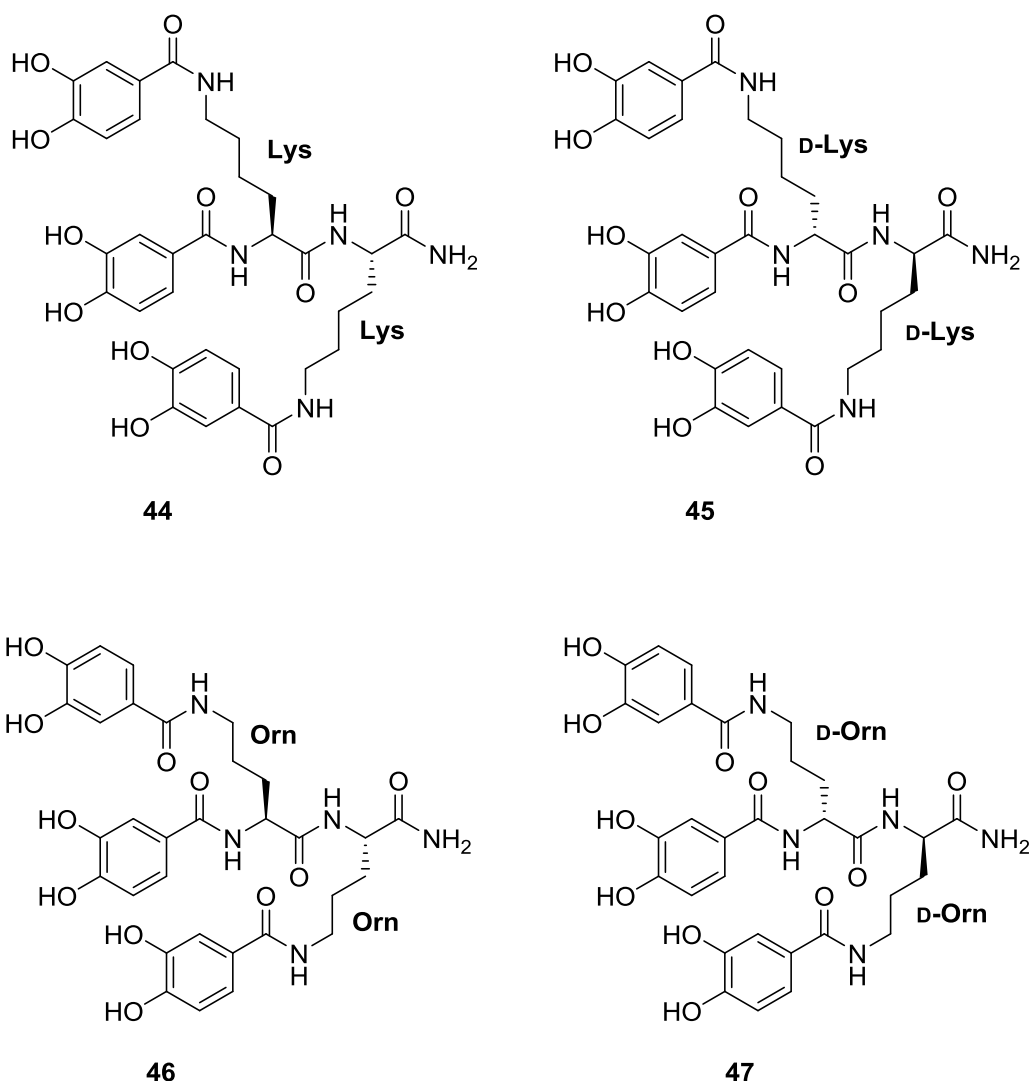


Abbildung 42: Synthetisierte *end-caps* mit unterschiedlicher Länge der Seitenkette und Stereochemie.

Mithilfe der verschiedenen *caps* ist es möglich den Einfluss der Stereochemie sowie der Länge der Seitenketten auf das Binden einer Kollagen-Tripelhelix zu untersuchen.

3.2.4. Kovalent reversibles *capping* einer Kollagen-Tripelhelix

Um das kovalent reversible *capping* besser untersuchen zu können, wurde zunächst eine theoretische Betrachtung durchgeführt. Dies ist von großer Wichtigkeit, da im Gegensatz zum kovalent irreversiblen *capping* nicht nur ein Gleichgewicht zwischen tripelhelikaler und nicht-tripelhelikaler Spezies betrachtet werden muss, sondern

auch weitere Gleichgewichte zwischen *capped* und *uncapped* Spezies möglich sind. Dabei wird in einem ersten Schritt nur zwischen vollständig *capped* und vollständig *uncapped* unterschieden (Abbildung 43).

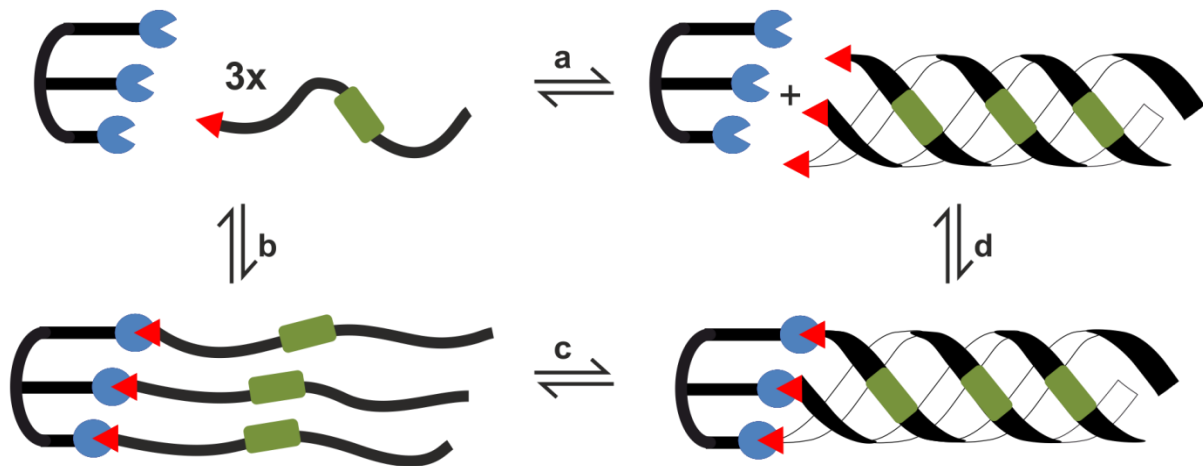


Abbildung 43: Schematische Darstellung der möglichen Spezies beim kovalent reversiblen *capping*. Zu sehen sind das Gleichgewicht zwischen *uncapped* Einzelsträngen und *uncapped* Tripelhelix (oben, a), das Gleichgewicht zwischen *uncapped* und *capped* Einzelsträngen (links, b), das Gleichgewicht zwischen *uncapped* Einzelsträngen und *capped* Tripelhelix (unten, c) und das Gleichgewicht zwischen *uncapped* und *capped* Tripelhelix (rechts, d). Die grünen Kästchen sollen dabei eine Repetiereinheit darstellen.

Dabei ist anzunehmen, dass es sich bei der Bildung der *capped* Tripelhelix aus dem *cap* und den Einzelsträngen um einen zweistufigen Prozess handelt, wobei prinzipiell zwei Möglichkeiten denkbar sind. Zum einen im ersten Schritt das *capping* der Einzelstränge und im Zweiten eine Assemblierung der Einzelstränge zur Tripelhelix. Zum anderen im ersten Schritt eine Bildung der Tripelhelix aus den Einzelsträngen und im Zweiten ein *capping* der Tripelhelix. Wobei immer angenommen wurde, dass ein *cap* selektiv an einer Tripelhelix bindet und keine intertripelhelikale Bindungen geknüpft werden.

Um genauere Aussage zum *capping* treffen zu können, wurde eine Titration von Orn-*cap* **46** mit dem Benzoboroxol-modifizierten Kollagen-Modellpeptid **37** durchgeführt, was daher als eine Untersuchung des Gleichgewichtes zwischen *capped* und *uncapped* Tripelhelix (Gleichgewicht d in Abb. 43) aufgefasst werden kann. Dazu wurde Orn-*cap* **46** im NMR-Röhrchen in Phosphatpuffer (50 mM, pH = 7,4 in D₂O) vorgelegt (Konz. = 330 µM, entspricht 1 mM Catechol-Funktionalität). Schrittweise wurden 1, 2, 3, 6 und 9 Äquivalente Kollagen-

Modellpeptid **37** zugegeben und jeweils ein ^1H -NMR-Spektrum aufgenommen (Abbildung 44).

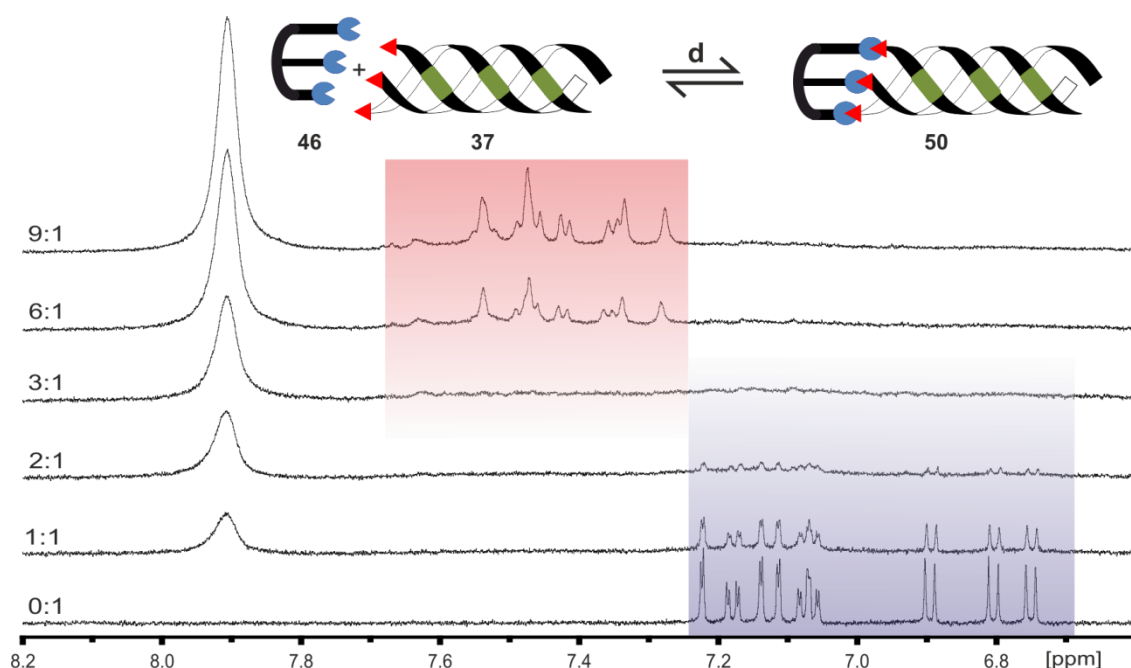


Abbildung 44: ^1H -NMR-Spektren (600 MHz, 300 K, pH = 7,4 Phosphatpuffer in D_2O) der Titration von Orn-cap **46** (Signale in blau dargestellt) mit 1, 2, 3, 6 und 9 Äquivalenten Kollagen-Modellpeptid **37** (Signale in rot dargestellt).

Deutlich sind die aromatischen Protonen des Orn-caps **46** im unteren Spektrum in Abwesenheit von Kollagen-Modellpeptid **37** zu sehen. Die Intensität der Signale nimmt mit zunehmender Menge **37** ab, bis bei einem Verhältnis von 3:1 kein Signal mehr zu sehen ist. Dieser massive Intensitätsverlust für Dioleinheit und Boroxol im gebundenen Zustand ist allerdings schon in der Literatur für das Binden von Zuckern beschrieben worden.^[129] Dieses Verhalten lässt sich hier allerdings ausnutzen um eine Aussage über die Bindung des caps zur Tripelhelix zu treffen. Da keine Benzoboroxol-Signale bis zu einem Verhältnis von 3:1 beobachtet werden, lässt sich sagen, dass die Tripelhelix vollständig gebunden vorliegen muss. Da bei diesem Verhältnis auch keine Signale der aromatischen Protonen mehr beobachtet werden konnten, liegt ebenfalls kein ungebundenes cap **46** mehr in Lösung vor. Erst bei größeren Mengen Kollagen-Modellpeptid **37** sind wieder Signale für die Tripelhelix zu beobachten. Dieses Verhalten ist allerdings nur auf das cap bzw. das Boroxol begrenzt, alle anderen Protonen erfahren im ^1H -NMR-Spektrum keine Signalverbreiterung oder Intensitätsverlust. Die Bildung der capped Tripelhelix **50** lässt sich damit ohne Überschuss einer Komponente (Diol oder Boroxol) realisieren.

Dies ist dabei das erste Beispiel, bei dem das Gleichgewicht zwischen Diol und Boroxol (hier **46** und **37**) in wässriger Lösung durch eine supramolekulare Assemblierung (hier in Form der Tripelhelix von **37**) vollständig auf Seite des Produktes (hier **50**) verschoben wurde.

3.2.5. Einfluss des *cappings* auf die Schmelztemperatur der Kollagen-Tripelhelix

Für den Einfluss des *cappings* auf die Schmelztemperatur der Tripelhelix zu untersuchen wurde, wie in Kapitel 3.2.4., eine theoretische Betrachtung des Schmelzprozesses durchgeführt. Dazu wurde die Annahme, dass nur *capped* oder *uncapped* Spezies vorliegen eingeschränkt, welche nur für eine Betrachtung unterhalb der Schmelztemperatur der Tripelhelix von **37** für sinnvoll erachtet wurde. Da aufgrund der unvollständigen Bindung des Modellsystems aus Kapitel 3.2.2. nicht mit der Vollständigen Bindung von drei Einzelsträngen zu rechnen ist, wurde Abbildung 43 um ein weiteres Gleichgewicht erweitert (Abbildung 45).

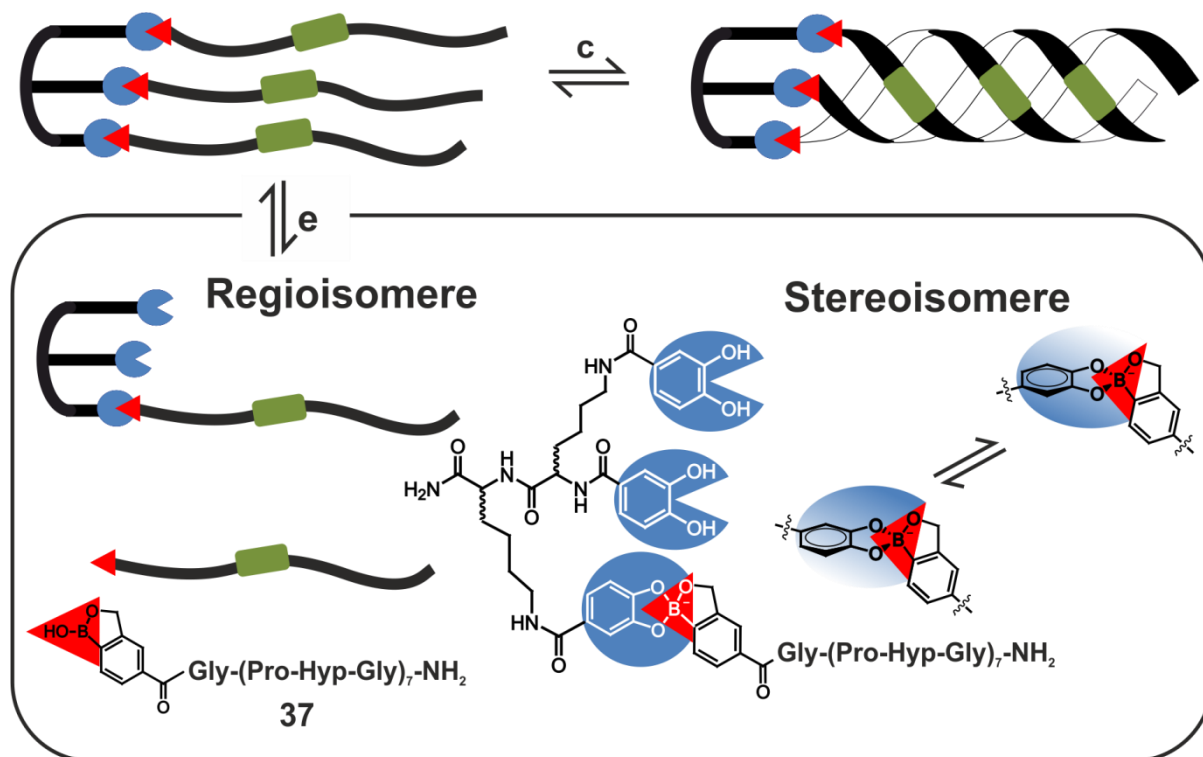


Abbildung 45: Das Aufschmelzen der *capped* Tripelhelix führt in einem ersten Gleichgewicht (c) zum *capped* Einzelstrang, welcher wiederum in einem Gleichgewicht (e) zu einer Vielzahl verschiedener Regio- und Stereoisomere führt. Ein mögliches Regioisomer und eine schematische Darstellung der Stereoisomere sind dabei unten gezeigt.

Somit steht der *capped* Einzelstrang im Gleichgewicht mit 20 verschiedenen Regio- bzw. Stereoisomeren, was für die Interpretation des Schmelzverhaltens berücksichtigt werden muss.

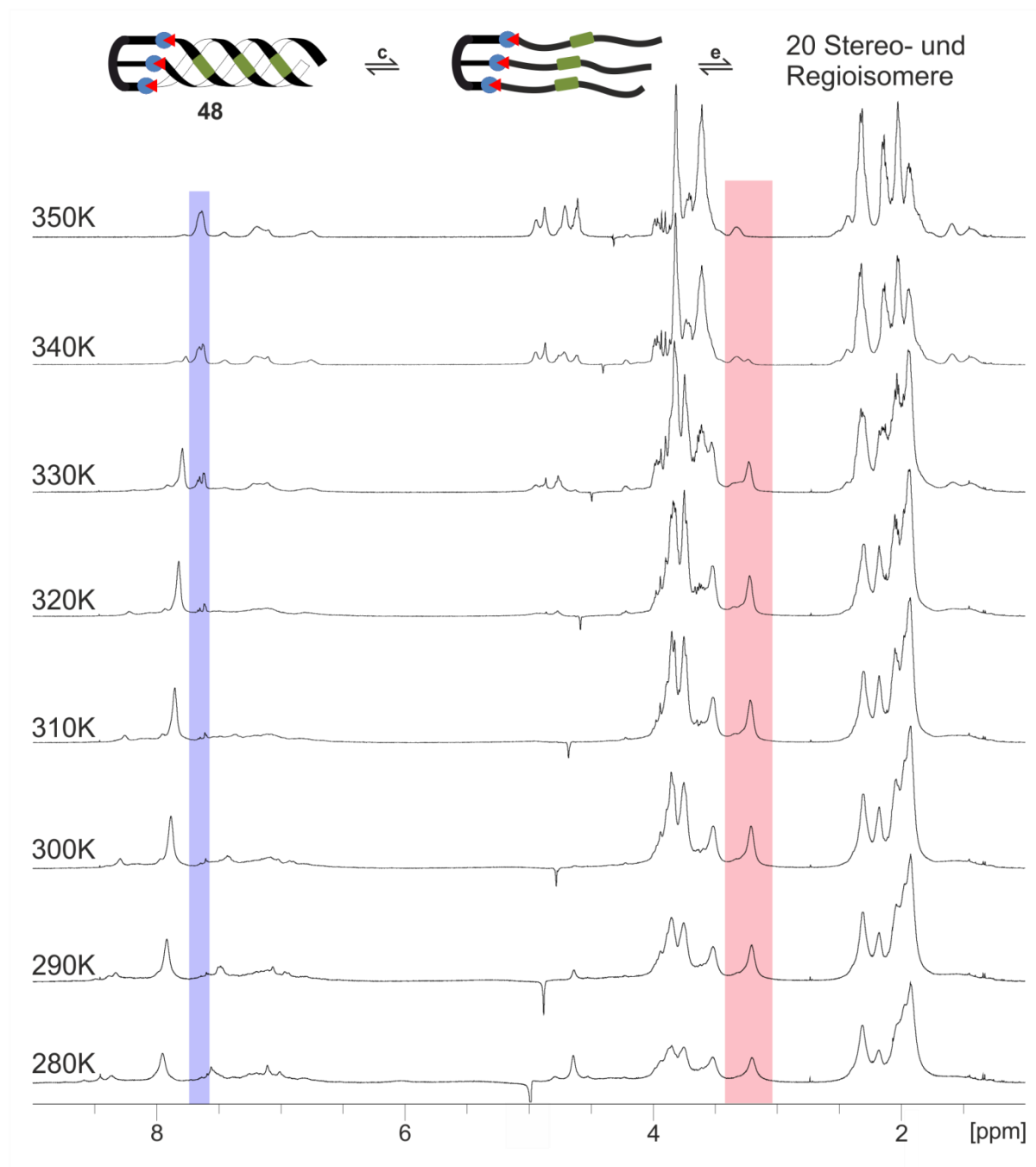


Abbildung 46: ^1H -NMR-Spektren der *capped* Tripelhelix **48** von 280 bis 350 K in 10 K Schritten (500 MHz, pH = 7,4 Phosphatpuffer/ D_2O 9:1). In rot markiert sind dabei die δ -Protonen des Prolins in tripelhelikaler Umgebung und in blau die aromatischen Protonen des Benzoboroxol von **37**.

Die *capped* Tripelhelix **48** zeigt dabei ein, im Vergleich zu *uncapped* Tripelhelix von **37**, sehr ähnliches Spektrum, was beispielsweise anhand der δ -Protonen der Proline in tripelhelikaler Umgebung bei etwa 3,2 ppm (Rot markiert in Abb. 46) zu sehen ist.

Da diese Protonen bis zu einer Temperatur von 340 K beobachtet werden können, kann dies als erstes Indiz für eine stabilisierende Wirkung des *cappings* mit **44** angesehen werden. Da allerdings kein hochfeldverschobenes δ -Proton für das N-terminale Prolin des *leading strands* (vgl. Kapitel 3.2.1.) beobachtet werden kann, muss die Orientierung der Benzoboroxole im tripelhelikal assemblierten Zustand von **48** von der Struktur ohne *cap* abweichen. Dies ist aufgrund der Rigidität der Diol-Benzoboroxol-Struktureinheit allerdings nicht weiter verwunderlich. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass eine starke Verbreiterung der *cap*-Signale von **44** nicht nur auf die Catecholstruktureinheit beschränkt ist, sondern bei allen Signalen Auftritt. **44** scheint also im *capped*-Zustand deutlich weniger strukturiert vorzuliegen als die Tripelhelix, bei der sich kein Intensitätsunterschied zwischen *capped* und *uncapped* Zustand beobachten lässt. Dies wurde auch durch die Beobachtung von, zwar immer noch verbreiterten, aber deutlich besser aufgelösten, *cap*-Protonen bei höheren Temperaturen bestätigt. Somit lässt sich sagen, dass ein thermisches Entfalten der tripelhelikalen Struktur auch mit einem teilweisen Kollaps der Boroxol-Diol-Bindung einhergeht. Ein thermisches Entfalten lässt sich demnach zwar vereinfacht beschreiben (Gleichgewicht c in Abb. 43 und Abb. 45), führt aber zu einer komplexen Gemischen aus 21 verschiedenen Regio- und Stereoisomeren (Gleichgewicht e in Abb. 45). Eine Charakterisierung des *cappings* anhand des Schmelzpunktes der *capped* Tripelhelix ist also das beste Kriterium um die Effektivität eines *caps* zu beschreiben. Bei der Bestimmung des tripelhelikal gefalteten Anteils tritt hier allerdings der Fall ein, dass *cap*-Protonen eine ähnliche chemische Verschiebung aufweisen wie die δ -Protonen der Proline in tripelhelikaler Umgebung. Das beobachtete Integral wurde um diese Protonenzahl (bestimmt bei 350 K) nach unten korrigiert, um einen verlässlichen Wert für den gefalteten Anteil ermitteln zu können. Dazu wurde auch der Einfluss von D-Lys-*cap* **45**, Orn-*cap* **46** und D-Orn-*cap* **47** auf den Schmelzpunkt der *capped* Tripelhelix **49**, **50** und **51** im Vergleich zur *uncapped* Tripelhelix **37** untersucht (Abbildung 47).

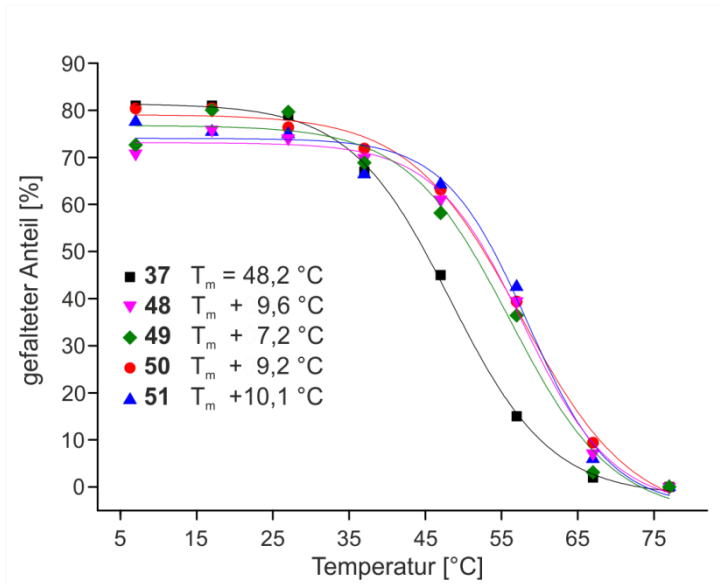


Abbildung 47: Schmelzkurven der *capped* Tripelhelix **48** (in violett), **49** (in grün), **50** (in rot) und **51** (in blau) sowie des Kollagen-Modellpeptids ohne *cap* **37** (in schwarz). Deutlich zu erkennen ist der höhere Schmelzpunkt durch das *capping*. Die sigmoidalen Kurvenverläufe sind durch die farbigen Linien dargestellt.

Dabei konnte beobachtet werden, dass die Tripelhelix in allen Fällen stabilisiert wurde. Das *capping* mit dem Lys-cap **44** führte zu einer Stabilisierung von 9,6 °C, während ein *capping* mit dem Enantiomer **45** lediglich zu einer Stabilisierung von 7,2 °C führt. Die Stabilisierung der Tripelhelix durch kovalent reversibles *capping* ist damit deutlich geringer ausgeprägt als die Stabilisierung durch kovalent irreversibles *capping* mit einem Lys-Lys-Templat (>30 °C).^[87, 196] Auch das *capping* mit dem Orn-cap **46** und seinem Enantiomer **47** lieferte nur eine Stabilisierung von 9,2 °C und 10,1 °C, während das kovalent irreversible *capping* mit einem Orn-Orn-Templat zu einer Stabilisierung von 46 °C führt. Die gemessenen Stabilisierungen liegen dabei in einem Bereich, der auch mit der Koordination speziell modifizierten Einzelstränge durch Metallionen erreicht wurde.^[102, 103] Beim Vergleich der verschiedenen Schmelzkurven ist auch auffällig, dass ein *capping* mit den Lys-cap **44** und D-Lys-cap **45** bei niedrigen Temperaturen ein um 10% kleinerer Anteil von Pro- δ -Protonen in tripelhelikaler Umgebung im Vergleich zur *uncapped* Tripelhelix beobachtet wurde. Dies lässt sich durch ein „auseinanderziehen“ des N-Terminus infolge einer Bindung zum *cap* erklären, was auch erklärt warum der geringere gefaltete Anteil beim, in den Seitenketten um eine CH₂-Gruppe verkürztes, Orn-cap **46** gar nicht und beim D-Orn-cap **47** nur minimal zu beobachten ist. Damit lässt sich auch das unterschiedliche Verhalten der beiden Enantiomerenpaare erklären. Während bei Lys- und D-Lys-cap ein unterschied von 2,4 °C in der Stabilisierung

gemessen werden kann, liegt dieser für Orn- und D-Orn-cap lediglich 0,9 °C. Eine ungünstige Stereochemie des caps, was D-Aminosäuren üblicherweise betrifft, kann also durch eine bessere Geometrie am N-Terminus kompensiert oder sogar überkompensiert werden. Dies bestätigt noch einmal, dass Tripelhelix und cap einer direkten Wechselwirkung unterliegen und eben nicht entkoppelt voneinander vorliegen, wie es bei der Verwendung von längeren *spacer*-Sequenzen wie Gly-Gly oder β -Ala- β -Ala der Fall ist.^[88, 305]

Im diesem Zusammenhang bietet sich auch eine Analyse des Schmelzbereiches an. Der Schmelzbereich ist dabei der Bereich zwischen der ersten Abnahme des Anteils an tripelhelikaler Spezies und ihrem vollständigen verschwinden. Für die *uncapped* Tripelhelix **37** liegt der Schmelzbereich bei etwa 40 °C, bei der *capped* Tripelhelix **50** hingegen bei etwa 55 °C (Abbildung 48).

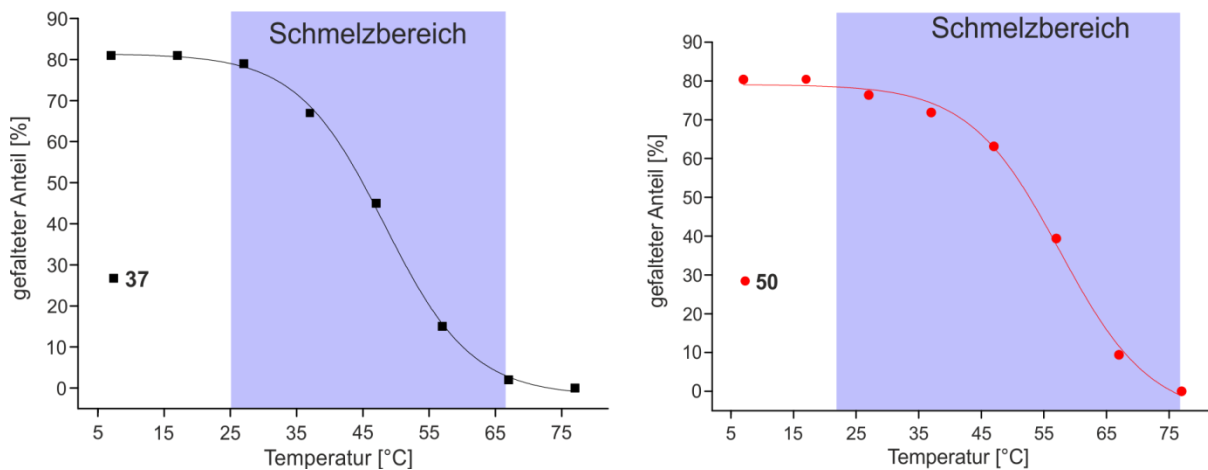


Abbildung 48: Vergleich der Schmelzbereiche von *uncapped* und *capped* Kollagen-Modellpeptiden **37** und **50**. Dabei konnte für die *uncapped* Tripelhelix **37** ein Schmelzbereich von 40 °C und für die *capped* Tripelhelix **50** ein Schmelzbereich von etwa 55 °C beobachtet werden. Der sigmoidale Kurvenverlauf ist durch die rote bzw. schwarze Linie dargestellt.

Dabei ist vor allem interessant, dass sich der Anfang des Schmelzbereiches zwischen *capped* und *uncapped* Tripelhelix kaum ändert. Eine Stabilisierung der Tripelhelix durch *capping* sollte allerdings mit einem späteren Einsetzen der Entfaltung, also einem Beginn des Schmelzbereiches bei höherer Temperatur einhergehen.^[84, 88, 212, 305] Bei einer effizienten Stabilisierung sollte außerdem der Schmelzbereich deutlich kleiner sein. Demnach könnte die Stabilisierung durch kovalent reversibles *capping* vor allem darauf zurückzuführen sein, dass der Schmelzbereich in Richtung höherer Temperaturen ausgedehnt wird, was automatisch mit einer höheren Schmelztemperatur einhergeht. Also wird die tripelhelikale Struktur bei niedriger Temperatur nicht stabilisiert, sondern das *capping*

sorgt dafür, dass bei höherer Temperatur das Gleichgewicht zwischen Einzelstrang und Tripelhelix auf die Seite der Tripelhelix verschoben wird. Eine Stabilisierung der tripelhelikalen Struktur durch eine Erweiterung des Schmelzbereiches durch terminales *capping* ist bisher noch nicht Literaturbekannt und scheint nur beim kovalent reversiblen *capping* in relevantem Maße aufzutreten.

In Kooperation mit GEBAUER aus der Arbeitsgruppe BAUMANN der Universität Köln gelang es außerdem Einkristalle von **48** zu erhalten. Diese konnten am *Swiss Light Source* des Paul Scherer Instituts untersucht werden (Abbildung 49).

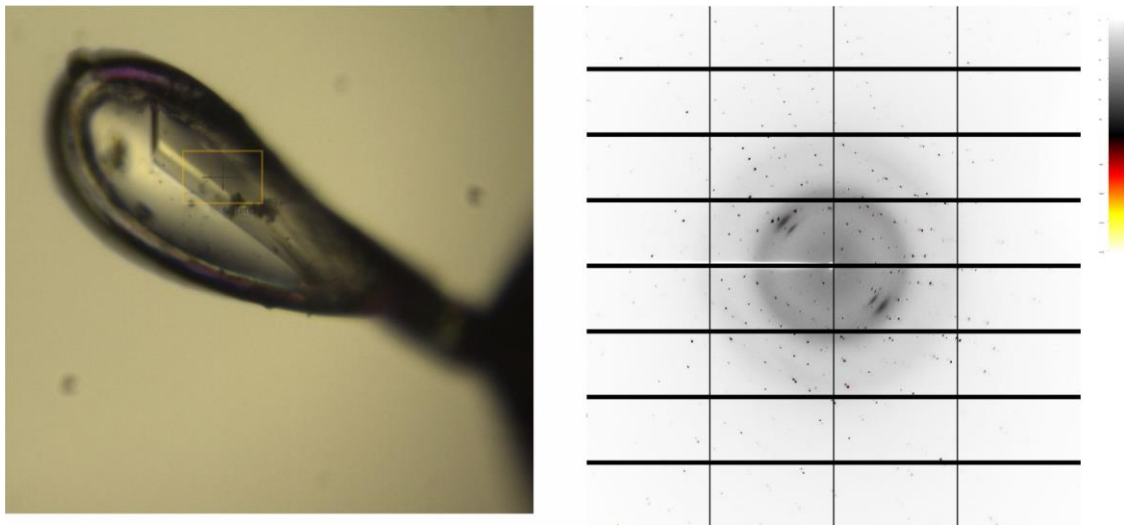


Abbildung 49: Links: Einkristall von **48**. Das gelbe Rechteck hat dabei Kantenlängen von 40 und 60 μm . Rechts: Ein am *Swiss Light Source* des Paul Scherer Instituts von GEBAUER erhaltenes Diffraktogramm. Die diskreten Beugungspunkte sind dabei deutlich zu erkennen.

Dabei konnten zwar Diffraktogramme erhalten werden, allerdings war, bedingt durch ein Phasenproblem, ein Lösen der Struktur bis zu diesem Zeitpunkt nicht möglich. Dies lässt allerdings erwarten in Zukunft eine deutlich detailliertere Aussage über die Geometrie des *caps* treffen zu können.

3.2.6. Einfluss von positiven Permanentladungen am Kollagen Einzelstrang auf das *capping*

Gerade im Hinblick auf Fällungsexperimente mit *capped* und *uncapped* Kollagen-Modellpeptiden ist eine Betrachtung der Ladungsstruktur unabdingbar. Die negativen Ladungen der durch *capping* gebildeten Boronate führen dabei zu einer dreifach negativen Formalladung der *capped* Kollagen-Modellpeptide **48-51**. Durch die Delokalisation der negativen Ladung am Boratom über die benachbarten Sauerstoffatome kann also eine diffuse, negative Ladungsverteilung am N-Terminus des Kollagen-Modellpeptids angenommen werden.^[126, 147] Eine Fällung von Silica

wird dagegen von polykationischen Peptiden^[168, 169, 315–318] bzw. Polyaminen^[319, 320] und kovalent irreversibel *capped* Kollagen-Modellpeptiden mit einem Überschuss positiver Permanentladungen induziert.^[87] Eine Modifikation des Kollagen-Einzelstranges mit einer positiven Permanentladung, welche die negative Ladung durch das *capping* ausgleicht ist daher unerlässlich.

3.2.6.1. C-terminale Modifikationen

Um vorerst eine direkte intratripelhelikale Interaktion zwischen positiver und negativer Permanentladung ausschließen zu können, war eine C-terminale Verlängerung der Sequenz von **37** mit einem Lysin der erste Ansatz. Das Lysin nimmt dabei eine Xaa-Position in der Kollagensequenz ein. Dies sollte außerdem die Vergleichbarkeit zu den kovalent irreversible *capped* Kollagen-Modellpeptiden, welche bereits in der Fällung von Silica eingesetzt wurden, herstellen. Diese Verbindungsklasse weisen am C-Terminal negative und am N-Terminal positive Permanentladungen auf.^[87, 196] Dies führte zu Kollagen-Modellpeptid Borox-G-(PUG)₇-K-NH₂ (**52**) welches einen Schmelzpunkt von 47,1 °C aufwies (Abbildung 50).

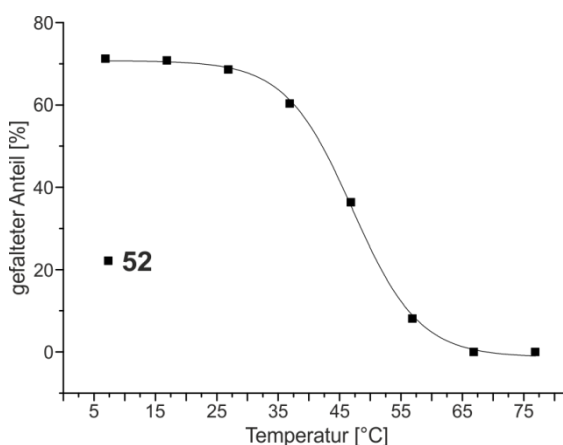


Abbildung 50: Schmelzkurve von Borox-G-(PUG)₇-K-NH₂ (**52**). Der sigmoidale Kurvenverlauf ist durch die schwarze Linie dargestellt.

Deutlich zu erkennen ist dabei der mit 70% im Vergleich zu **37** mit 80%, leicht reduzierte maximale gefaltete Anteil. Die lässt sich allerdings mit der zusätzlichen N-terminalen Aminosäure und der damit verbundenen hohen positiven Ladungsdichte erklären. Dies sorgt dafür, dass sich minimal weniger Pro- δ -Protonen in tripelhelikaler Umgebung befinden, ein Effekt der auch schon beim *capping* beobachtet werden konnte (Kap. 3.2.5.). Der ebenfalls um 1,1 °C geringere

Schmelzpunkt bestätigt den kleinen destabilisierenden Effekt des C-terminalen Lysins.

Ein *capping* von **52** zur *capped* Tripelhelix **53** zeigte hingegen ein unerwartetes Verhalten. Nach Zugabe des Lys-caps **44** wurde ein farbloser Niederschlag sichtbar. Dieser erwies sich dabei als vollkommen unlöslich, da nach zentrifugieren und waschen des Niederschlags in der überstehenden Lösung keine Substanz im ^1H -NMR-Spektrum beobachtet werden konnte. Um die Zusammensetzung des Niederschlags zu untersuchen wurde pH = 3 Phosphatpuffer zugegeben. Da bei diesem pH-Wert keine Bindung mehr zwischen Diol und Boroxol ausgebildet werden kann, ging der Niederschlag unter diesen Bedingungen in Lösung.^[126] Eine ^1H -NMR-spektroskopische Untersuchung bestätigte schließlich, dass es sich bei dem Niederschlag um **53** handeln muss, da Lys-cap **44** und Kollagen-Modellpeptid **52** in einem Verhältnis von 1:3 vorlagen. Dies bestätigt noch einmal die hohe Selektivität des *cappings* bei der Bindung genau einer Tripelhelix. Der Niederschlag wurde daraufhin von REINHARDT aus der Arbeitsgruppe HAMPP mikroskopisch untersucht, wobei Aggregate mit einem Durchmesser von 1 bis 1,5 μm beobachtet wurden (Abbildung 51).

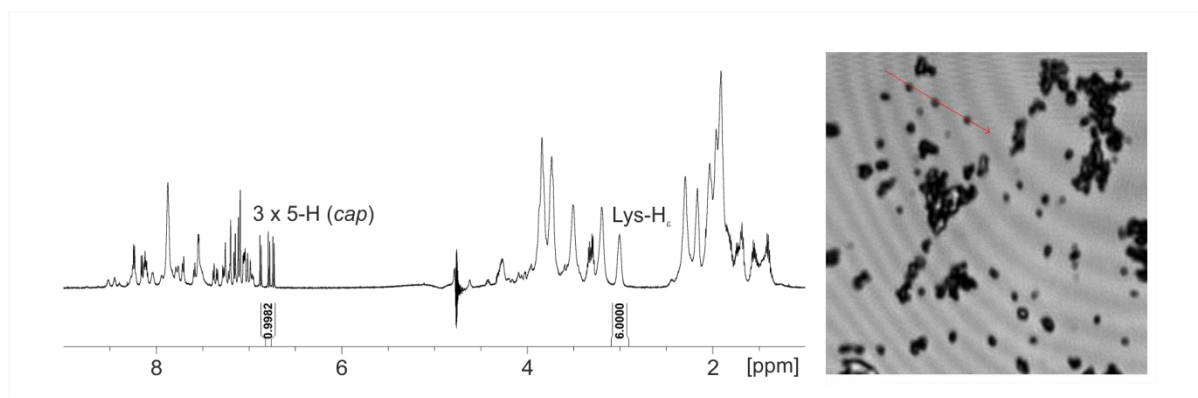
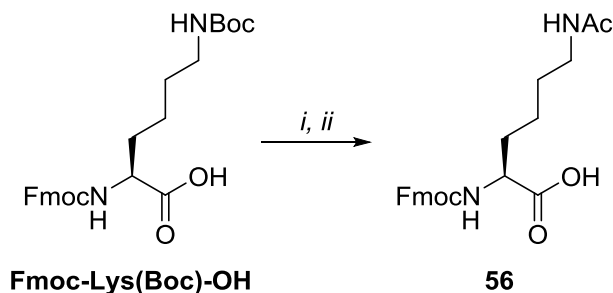


Abbildung 51: Untersuchung des Niederschlags von **53**. **Links:** ^1H -NMR-Spektrum (600 MHz, 300 K, pH = 3, 50 mM Phosphatpuffer) von **52**. Es ist zu sehen, dass Lys-cap **44** und Kollagen-Modellpeptid **52** unter diesen Bedingungen in Lösung in einem Verhältnis von 1:3 getrennt voneinander vorliegen. Mikroskopische Aufnahme des Niederschlags von **53**. Zu sehen sind Aggregate mit einem Durchmesser von 1 bis 1,5 μm .

Die Bildung eines unlöslichen Niederschlags durch terminale Ladungen ist bisher weder für *uncapped*, noch für *capped* Tripelhelices beschrieben.^[31, 87, 100] Um zu prüfen, ob die Niederschlagsbildung auf die positive Permanentladung der Lysinseitenketten zurückzuführen ist oder ob die Seitenketten in einer anderen Weise zur Aggregation beitragen, wurde das seitenkettenacetylierte Derivat **54** mit der Sequenz Borox-G-(PUG)₇-K(Ac)-NH₂ dargestellt.^[321] Da entsprechende

seitenkettenacetylierte Lysin-Baustein war dabei auf Fmoc-Lys(Boc)-OH zugänglich (Schema 25).



Schema 25: Darstellung von Fmoc-Lys(Ac)-OH (**56**) in 81% Gesamtausbeute. (i) TFA/DCM 1:4, RT, 30 min; (ii) Ac₂O, DIPEA, DCM, RT, 30 min.

Ein *capping* des Kollagen-Modellpeptids **54** mit dem Lys-cap **44** war zudem problemlos, also ohne die Bildung eines Niederschlags, möglich. Somit lässt sich sagen, dass die Permanentladungen der Lysinseitenketten für eine Niederschlagsbildung ursächlich sind, also eine Ladungsgetriebene Aggregation stattfindet.

Wie bei allen Kollagen-Modellpeptiden wurde auch für **54** und das entsprechende *capped* Derivat **55** eine Analyse des Schmelzverhaltens durchgeführt (Abbildung 52).

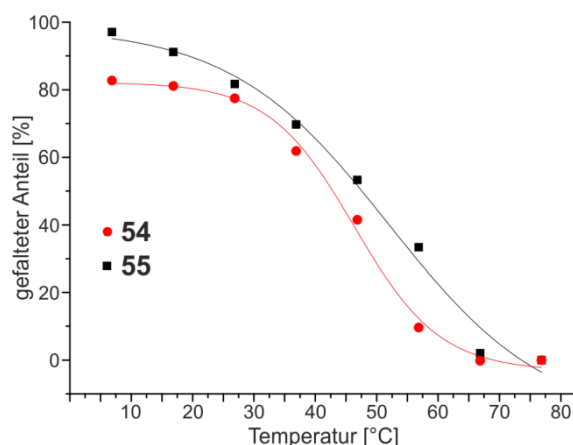


Abbildung 52: Schmelzkurven des Kollagen-Modellpeptids **54** und seinem *capped* Derivat **55**. Der sigmoidale Kurvenverlauf ist durch die rote bzw. schwarze Linie dargestellt.

Während das Schmelzverhalten des *uncapped* Kollagen-Modellpeptids **54** den Erwartungen entspricht und einen Schmelzpunkt von 46,4 °C aufweist, welcher minimal kleiner als der für das nicht acetylierte Derivat **52** ist, zeigt die Kurve für das *capped* Derivat **55** einen ungewöhnlichen Verlauf. Zum einen liegt der gefaltete Anteil bei niedrigen Temperaturen deutlich höher als üblich, zum anderen zeigt die

Schmelzkurve einen vom üblichen sigmoidalen Verlauf abweichendes Verhalten. Der erhöhte gefaltete Anteil bei Temperaturen von 6 und 16 °C kann damit erklärt werden, dass die acetylierten Lysinseitenketten am C-Terminus durch einen hydrophoben Effekt, im Zusammenspiel mit dem N-terminalen *capping*, eine Entfaltung der Tripelhelix hemmen. Eine Stabilisierung durch Modifikation mit hydrophoben Alkylketten ist dabei auch schon in der Literatur beschrieben.^[321] Somit wird ein höherer gefalteter Anteil, also Pro- δ -Protonen in tripelhelikaler Umgebung, beobachtet. Der deutlich abweichende Kurvenverlauf ist direkt mit diesem Effekt verbunden. Zum einen erstreckt sich der Schmelzbereich nahezu über den kompletten Messbereich. Zum anderen wird dadurch eine exakte Bestimmung der Schmelztemperatur erschwert, sodass nur ein Wert von 52 °C angegeben kann. Die Stabilisierung durch das Lys-cap **44** fällt mit 5,6 °C auch deutlich geringer aus. Anhand dieses Beispiels lässt sich sehr gut die Komplexität des kovalent reversiblen *capping* von Kollagen-Modellpeptiden durch die verschiedenen komplexen Gleichgewichte, welche sich in der Regel nicht isoliert voneinander betrachten lassen.

Die Bildung eines unlöslichen Niederschlags konnte jedoch ausgenutzt werden, um die Dynamik eines kovalent reversiblen *capping* näher zu untersuchen. Dazu wurde das lösliche *capped* Kollagen-Modellpeptid **48** zum *uncapped* Kollagen-Modellpeptid **52** gegeben. Nach wenigen Minuten wurde ein farbloser Niederschlag in der zuvor klaren Lösung sichtbar. Es muss also ein langsamer Austausch des caps von einer Tripelhelix auf die Andere stattfinden. Nach 18 Stunden wurde der Niederschlag zentrifugiert und mehrfach gewaschen. Der Rückstand wurde dann mittels ¹H-NMR-Spektroskopie untersucht (Abbildung 53).

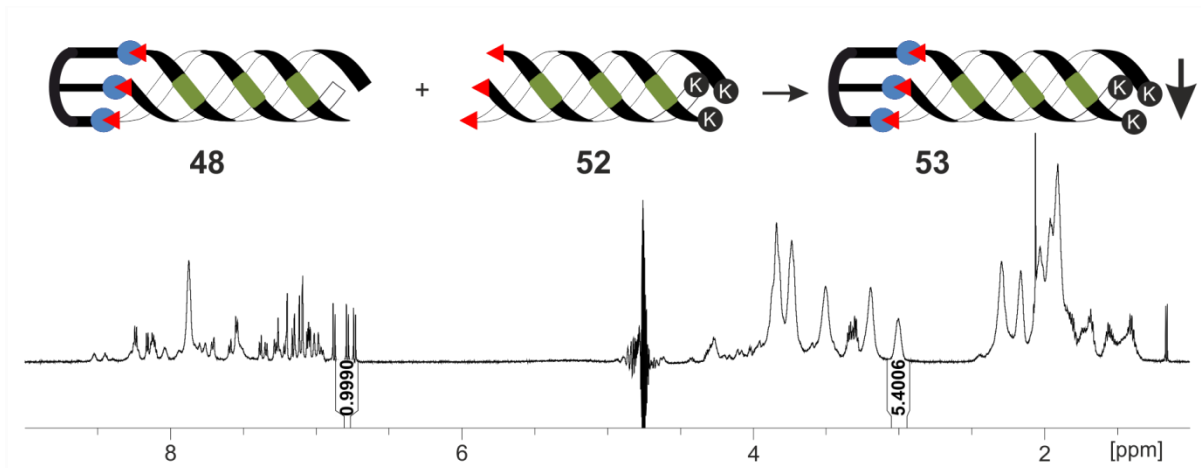


Abbildung 53: Konkurrenzexperiment zwischen der *capped* Tripelhelix **48** und dem Lysin-modifizierten Kollagen-Modellpeptid **52** führte zur Bildung eines Niederschlags. **Unten:** ^1H -NMR-Spektrum (600 MHz, 300 K, pH = 3, 50 mM Phosphatpuffer/D₂O 9:1) des Niederschlags.

Es ist zu erkennen, dass der untersuchte Niederschlag nicht vollständig, sondern nur zu 90% (Das Integral des Lys-H_ε-Signals hat einen Wert von 5,4 statt 6,0; vgl. Abb. 51) aus der *capped* Tripelhelix **53** besteht. Untersuchungen mittels RP-HPLC bestätigten dies. Für diese Beobachtung sind zwei Ursachen möglich. Zum einen besteht die Möglichkeit, dass die *capped* Tripelhelix **48** zusammen mit **53** ausgefällt wird, zum anderen dass sich im uncapped Zustand zum kleinen Teil Heterotrimere aus **37** und **52** bilden, welche im *capped* Zustand ebenfalls unlöslich sind. Zwar kann keine der beiden Möglichkeiten ausgeschlossen werden, jedoch lässt sich sagen, dass ein kovalent reversibles *capping* der Tripelhelix deutlich schneller abläuft als eine Des- und Reassemblierung der helikalen Struktur. Dies ist ebenfalls die Erklärung für die verringerte stabilisierende Wirkung im Vergleich zum kovalent irreversiblen *capping*.

3.2.6.2. Einfluss der Kettenlänge auf die Niederschlagsbildung

In Anbetracht der Unlöslichkeit von **53** wurde im Folgenden untersucht, inwieweit sich eine verringerte Anzahl von PUG-Repetiereinheiten auf die Bildung eines Niederschlags auswirkt. Dazu sollte geklärt werden, ob sich ab einer gewissen Kettenlänge lösliche Aggregate bilden bzw. sich die Eigenschaften des Niederschlags je nach Kettenlänge unterscheiden. Dazu wurden die Kollagen-Modellpeptide Borox-G-(PUG)₃-K-NH₂ (**57**) mit drei und Borox-G-(PUG)₅-K-NH₂ (**58**) mit fünf Repetiereinheiten dargestellt. Neben dem Schmelzpunkt von 47,1 °C für **52** konnte auch für das Kollagen-Modellpeptid mit fünf Repetiereinheiten **58** ein

Schmelzpunkt von 27,6 °C ermittelt werden. **57** lag hingegen nicht als Tripelhelix vor (Abbildung 54)

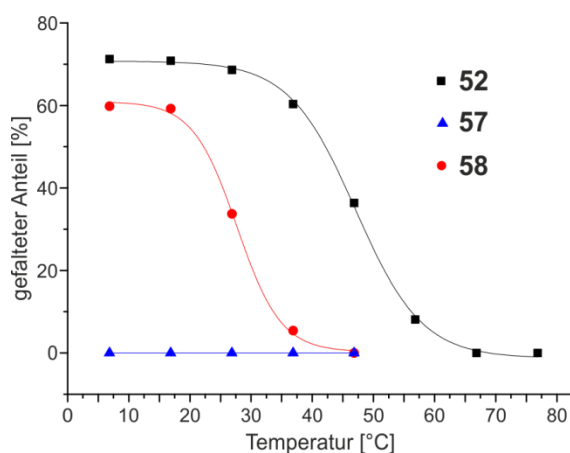


Abbildung 54: Mittels ^1H -NMR-Spektroskopie ermittelte Schmelzkurven der Kollagen-Modellpeptide mit 3, 5 und 7 Repetiereinheiten **57**, **58** und **52**. Der sigmoidale Kurvenverlauf ist durch die rote bzw. schwarze Linie dargestellt.

Für das Kollagen-Modellpeptid mit fünf Repetiereinheiten **58** ist dabei deutlich ein geringer maximaler gefalteter Anteil zu erkennen. Dieser ist allerdings mit der kürzeren Kettenlänge zu erklären, welche das Gleichgewicht zwischen Tripelhelix und Einzelstrang mehr auf die Seite des Einzelstrangs verschiebt. Ebenfalls fällt der Schmelzpunkt mit 27,6 °C erstaunlich hoch aus.^[62] Ein minimal verringerter Schmelzbereich ist ebenfalls durch die verkürzte Kettenlänge zu erklären.

Ein *capping* des Kollagen-Modellpeptids mit fünf Repetiereinheiten **58** mit Lys-cap **44** führte dabei ebenfalls zu einem unlöslichen Niederschlag **59**. Ein *capping* von **57** führte hingegen zu keiner Niederschlagsbildung von **60**. Erstaunlicherweise ließ sich eine Trübung der Lösung durch abkühlen im Eisbad erreichen, also einer Temperatur, bei welcher der Einzelstrang **57** ohne Lys-cap **44** keine tripelhelikale Struktur einnimmt. Eine Niederschlagsbildung scheint also hier Temperaturabhängig zu sein, was zum zu der Frage führt, inwieweit sich auch die Niederschläge von **59** und **53** bei höherer Temperatur in Lösung bringen lassen. Zunächst wurde jedoch eine NMR-spektroskopische Untersuchung der Niederschlagsbildung von **60** durchgeführt. Da sich der Feststoff nicht direkt betrachten lässt, wurde eine Quantifizierung des Feststoffs indirekt durchgeführt, indem die Signale der Verbindungen in Lösung zu einem TSP-Standard ins Verhältnis gesetzt wurden. Anhand des Verhältnisses bei der höchsten gemessenen Temperatur, lässt sich die Abnahme der Signalintensität und damit der Anteil an Niederschlag ermitteln. Dieser

Wert kann allerdings nur als Maximalwert angesehen werden, da nicht ausgeschlossen werden kann das die Bildung von löslichen Oligomeren, welche ebenfalls NMR-spektroskopisch nicht beobachtet werden können, zum Intensitätsverlust beitragen (Abbildung 55).

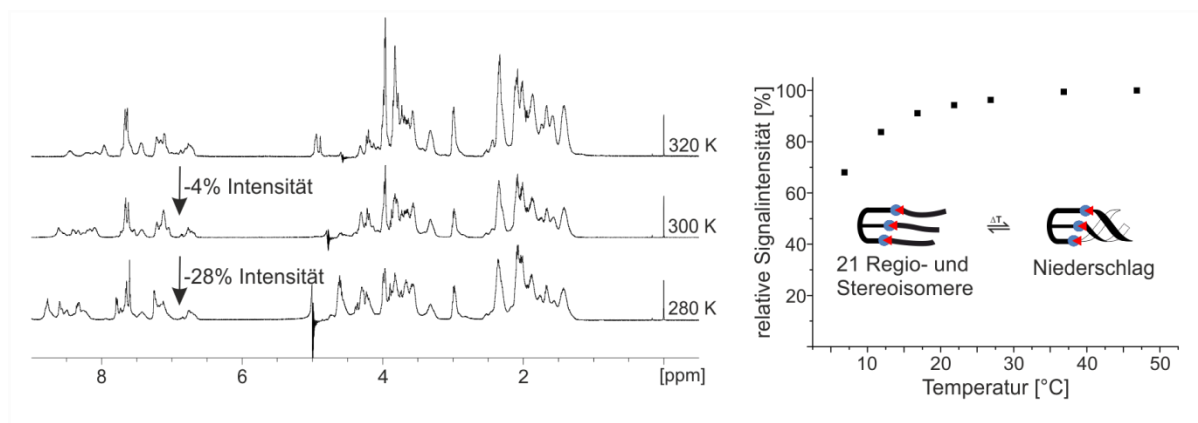


Abbildung 55: Temperaturabhängigkeit der Niederschlagsbildung von **60**. **Links:** ¹H-NMR-Spektren (600 MHz, pH = 7,4 50mm Phosphatpuffer/D₂O 9:1) von **60** bei 280 K, 300 K und 320 K. Dabei sind zwischen den Spektren Intensitätsverluste von 4% und 28% auf. **Rechts:** Graphische Darstellung der relativen Signalintensität in Abhängigkeit der Temperatur.

Die Untersuchung der relativen Signalintensität deutet dabei auf die Bildung von löslichen Oligomeren hin, da bereits eine Verringerung der Signalintensität beobachtet werden kann ohne das eine Niederschlagsbildung sichtbar wird. Es ist also wahrscheinlich, dass sich die Oligomerisierung durch die Temperatur steuern lässt und sich erst bei einer Temperatur von unter 7 °C unlösliche Aggregate von **60** bilden. Das unter diesen Bedingungen von **60** eine tripelhelikale Struktur in Oligomeren und Niederschlag eingenommen wird, ist anzunehmen, da bereits ein kovalent irreversibles Kollagen-Modellpeptid mit C-terminalen *cap* und drei PUG-Repetiereinheiten beschrieben ist.^[305]

Nun galt es zu überprüfen ob sich dieser vollkommen reversible Prozess der temperaturabhängigen Niederschlagsbildung auch für die Kollagen-Modellpeptide **59** und **53** mit fünf bzw. sieben Repetiereinheiten beobachten ließ. Dazu wurden diese langsam erhitzt bis, rein qualitativ, kein Niederschlag mehr sichtbar war. Neben der Niederschlagsbildung für das *capped* Kollagen-Modellpeptid **60** mit drei Repetiereinheiten unterhalb von 7 °C, konnte der Niederschlag von **59** mit fünf Repetiereinheiten oberhalb von 45 °C und sogar der Niederschlag von **53** mit sieben Repetiereinheiten oberhalb von 95 °C in Lösung gebracht werden (Abbildung 56).

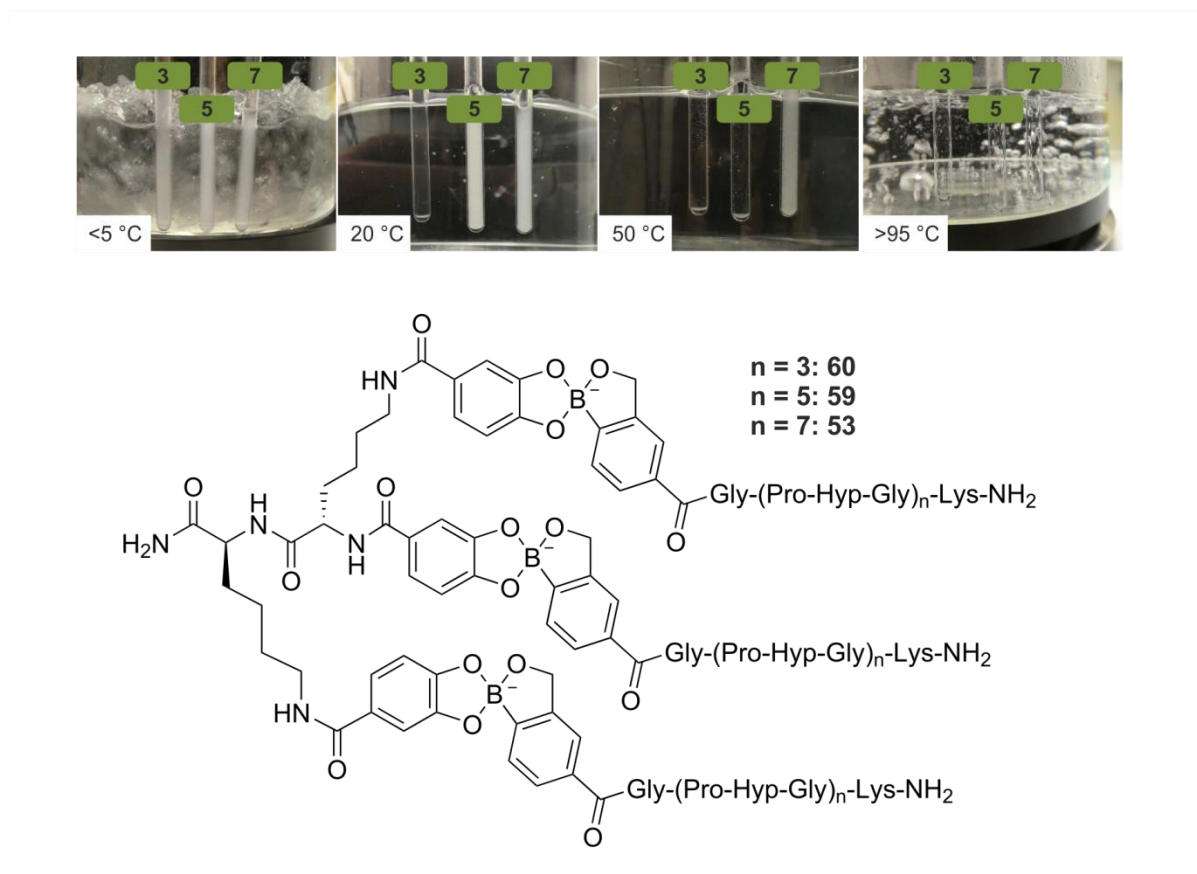


Abbildung 56: Niederschläge von **53**, **59** und **60** bei <5 °C, 20 °C, 50 °C und >95 °C.

Wie bereits beschrieben, war der Prozess von Niederschlagsbildung und –auflösung vollkommen reversibel. Allerdings zeigte sich eine starke Hysterese, denn die Niederschlagsbildung für das Kollagen-Modellpeptid mit sieben Repetiereinheiten **53** war beim Abkühlen erst unterhalb von 50 °C zu beobachten. Die Niederschlagsbildung von **59** setzte hingegen erst unterhalb von 30 °C ein. Diese Temperaturen entsprechen nahezu den Schmelztemperaturen der *uncapped* Kollagen-Modellpeptide **52** und **58**. Das weist darauf hin, dass die erst durch das *capping* einer tripelhelikalen Struktur in Lösung eine Aggregatbildung ermöglicht wird, welche letztlich zur Niederschlagsbildung führt. Diese Verbindungsklasse ist auch die erste, welche eine ladungsgetriebene und über die Anzahl der Repetiereinheiten steuerbare Aggregation von Kollagen-Modellpeptiden ermöglicht. Für eine ladungsinduzierte Trimerisierung wurde sogar eine Existenz von Aggregaten ausgeschlossen und konnte außerdem für *uncapped* Kollagen-Modellpeptide mit vergleichbarem Ladungsmuster nicht beobachtet werden.^[24, 191] Lediglich bei hochgeladenen Kollagen-Modellpeptiden wurde eine Möglichkeit zur Aggregation in Form von Fibrillen diskutiert aber ebenfalls nicht beobachtet.^[31] Im

Fälle von **53** wurden allerdings keine Fibrillen, sondern kugelförmige Aggregate beobachtet.

In Kooperation mit dem Arbeitskreis AIGNER an der Universität Leipzig wird zum jetzigen Zeitpunkt untersucht, ob sich die reversible Niederschlagsbildung von *capped* Kollagen-Modellpeptid **59** zum Wirkstofftransport eignet. Dabei soll untersucht werden, ob sich Wirkstoffe dabei an Orten hoher Temperatur selektiv freisetzen lassen.

3.2.6.3. Modifikationen am N-Terminus

Neben C-terminalen Modifikationen mit Permanentladungen, welche nur intermolekulare Wechselwirkung zwischen Lysin und Boronat ermöglicht, wurden im Folgenden Verbindungen untersucht, bei denen die Lysinmodifikation in räumlicher Nähe zum Boronat die Möglichkeit einer intramolekularen Wechselwirkung bietet. Dazu wurden zum einen die Verbindung Borox-K-(PUG)₇-NH₂ (**61**) dargestellt, bei der das N-terminale Glycin durch ein Lysin ersetzt wurde. Zum anderen Borox-G-K-(PUG)₇-NH₂ (**62**), bei dem zwischen N-terminalen Glycin und den PUG-Repetiereinheiten die Sequenz um ein Lysin erweitert wurde. Beide Kollagen-Modellpeptide weisen damit ein Lysin an einer Position auf, die in der Kollagen Sequenz normalerweise durch ein Glycin besetzt ist, unterscheiden sich jedoch im räumlichen Abstand zwischen Permanentladung und Boroxol (Boronat im *capped* Zustand). Für beide Verbindungen **61** und **62** wurde das Schmelzverhalten untersucht (Abbildung 57).

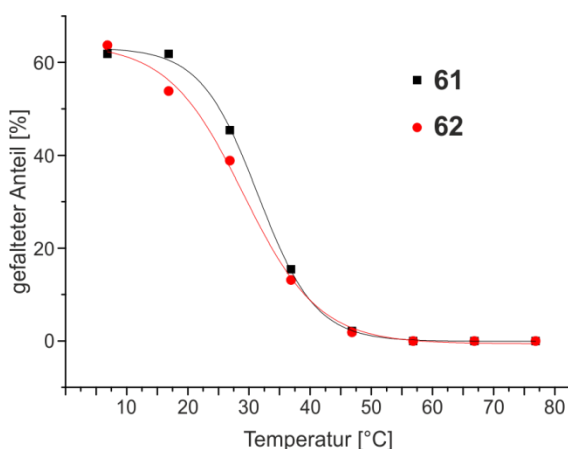


Abbildung 57: Mittels ¹H-NMR-Spektroskopie ermittelte Schmelzkurven der Kollagen-Modellpeptide **61** und **62** mit Schmelztemperaturen von 31,4 und 29,1 °C. Der sigmoidale Kurvenverlauf ist durch die rote bzw. schwarze Linie dargestellt.

Dabei fällt die deutlich verringerte Schmelztemperatur gegenüber Borox-G-(PUG)₇-NH₂ (**37**) mit $T_m = 48,2\text{ °C}$ auf. Auch der maximal gefaltete Anteil liegt mit etwa 62% in beiden Fällen deutlich unter dem von **37**. Dies lässt sich allerdings mit der Position des Lysins erklären, da bereits mehrfach beschrieben wurde, dass Mutationen der Glycin-Position der Kollagensequenz eine starke Destabilisierung der Tripelhelix zur Folge haben oder deren Bildung vollkommen verhindern.^[26, 322] Die Glycine der Kollagensequenz sind im Kern der Tripelhelix lokalisiert, daher führt die Einführung von Seitenketten zu einer enormen Destabilisierung. Da allerdings das N-terminale Glycin durch ein Lysin ersetzt wurde, führt dies wahrscheinlich zu einer Aufweitung der Tripelhelix an diesem Terminus, sodass der Schmelzpunkt und damit die thermische Stabilität der Tripelhelix eher einem Kollagen-Modellpeptid mit fünf Repetiereinheiten entspricht (vgl. 3.2.6.2.). Eine Verlängerung der Sequenz am N-Terminus um ein Glycin als *spacer* zwischen Permanentladung und Boroxol (**62**) verstärkt dies noch und führt zu einer weiteren, wenn auch kleinen, Destabilisierung, was sich in einer weiteren Absenkung des Schmelzpunktes bemerkbar macht.

Ein *capping* der Kollagen-Modellpeptide **61** und **62** mit Lys-cap **44** zu den *capped* Tripelhelices **63** und **64** führte im Gegensatz zu den Verbindungen mit C-terminaler Permanentladung zu keiner Niederschlagsbildung.

Eine NMR-spektroskopische Untersuchung der beiden *capped* Verbindungen zeigte jedoch zwei deutliche Abweichungen von allen bisher untersuchten *capped* Kollagen-Modellpeptiden. Zum einen waren keine Signale zu beobachten, welche einer tripelhelikalen Struktur zugeordnet werden konnten. Zum anderen waren die Signale in ihrer Intensität deutlich verringert, was sich in einem kleinen Signal zu Rausch äußerte. Der Intensitätsverlust, welcher im relativ zum TSP-Signal bestimmt wurde, betrug im ¹H-NMR-Spektrum bei 280 K 98% gegenüber dem Spektrum welches bei 350 K aufgenommen wurde. Dies deutet auf eine Aggregation der *capped* Tripelhelices **63** und **64** in Lösung hin. In diesem Fall führt dies nicht zu einem Niederschlag, sondern zu Aggregaten welche noch ausreichend solvatisiert sind, aber aufgrund ihrer Molekularmasse nicht mehr NMR-spektroskopisch beobachtet werden können. Die Bildung dieser Aggregate konnte durch ausnutzen des Tyndall-Effekt qualitativ visualisiert werden (Abbildung 58).

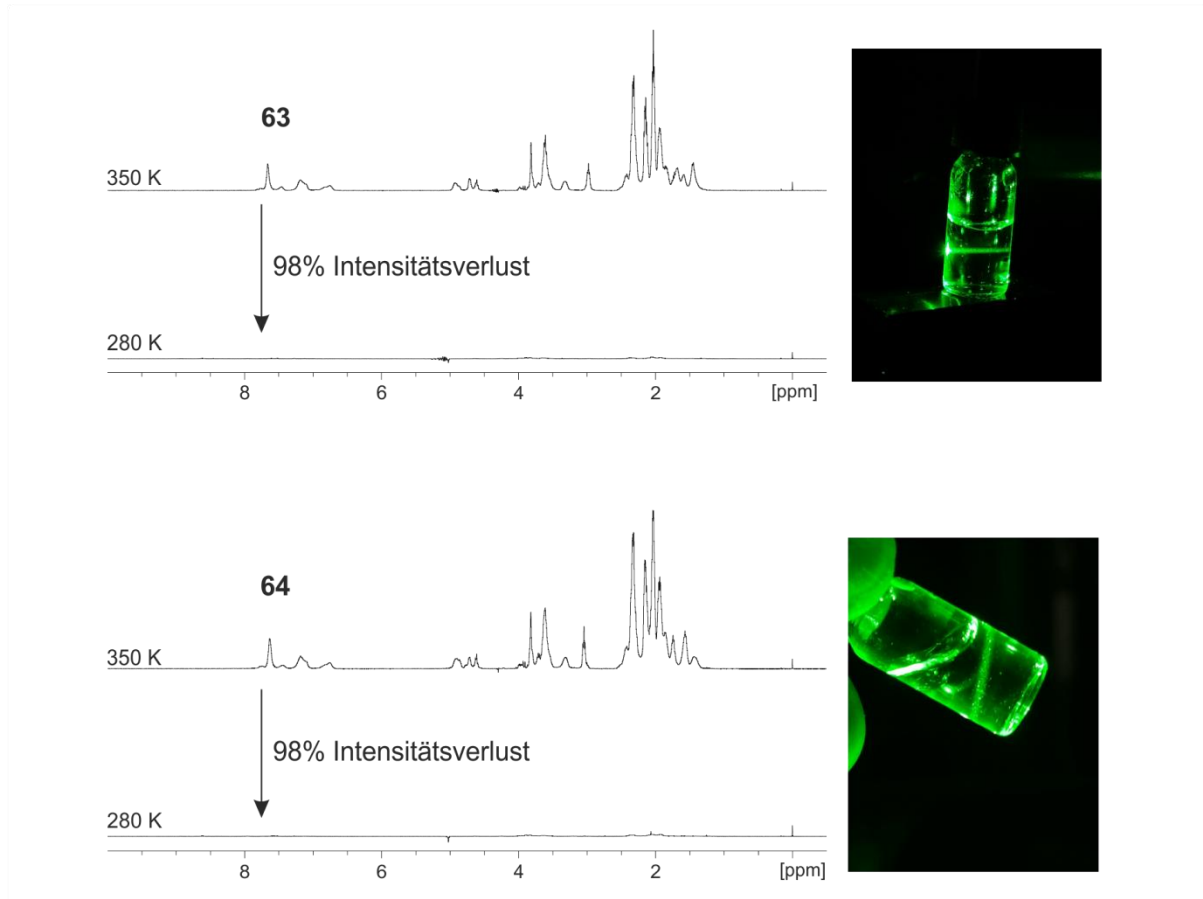


Abbildung 58: ^1H -NMR-Spektren (500 MHz, pH = 7,4 50 mM Phosphatpuffer/ D_2O 9:1) bei 280 K und 350 K der *capped* Kollagen-Modellpeptide **63** und **64**. Alle Spektren sind auf die Intensität des TSP-Signals skaliert und zeigen bei 280 K einen Intensitätsverlust von 98% gegenüber der Signalintensität bei 350 K **Rechts:** Aufnahmen des Tyndall-Effekts für beide Proben.

Da in Lösung keine isolierte tripelhelikale Struktur zu beobachten war, ist anzunehmen, dass nachdem das *cap* an die Tripelhelix bindet sofort die Bildung von hochmolekularen Aggregaten einsetzt. Eine Schmelzpunktbestimmung ist daher NMR-spektroskopisch nicht möglich. Aufgrund der zu erwartenden erhöhten Schmelztemperatur im aggregierten Zustand (Vgl. Kapitel 3.2.6.2.) wäre dieser allerdings auch nicht aussagekräftig, da er nicht mit anderen Vergleichbar ist. Dies bestätigt noch einmal die Aussagekraft der mittels ^1H -NMR-Spektroskopie ermittelten Schmelztemperaturen, da dort das thermische Entfalten einer isoliert in Lösung vorliegenden Tripelhelix beobachtet werden kann.

3.2.6.4. Änderung des Aggregationsgrades durch *capping*

Da eine Schmelzpunktbestimmung der *capped* Kollagen-Modellpeptide nur bei einer der untersuchten Verbindungsklassen, nämlich denen ohne zusätzliche positive Permanentladung, möglich war, stellt dies kein geeignetes Kriterium für die

Beschreibung kovalent reversibel *capped* Kollagen-Modellpeptide dar. Die *capped* Kollagen-Modellpeptide lassen sich dabei in drei Klassen einteilen (Abbildung 59).

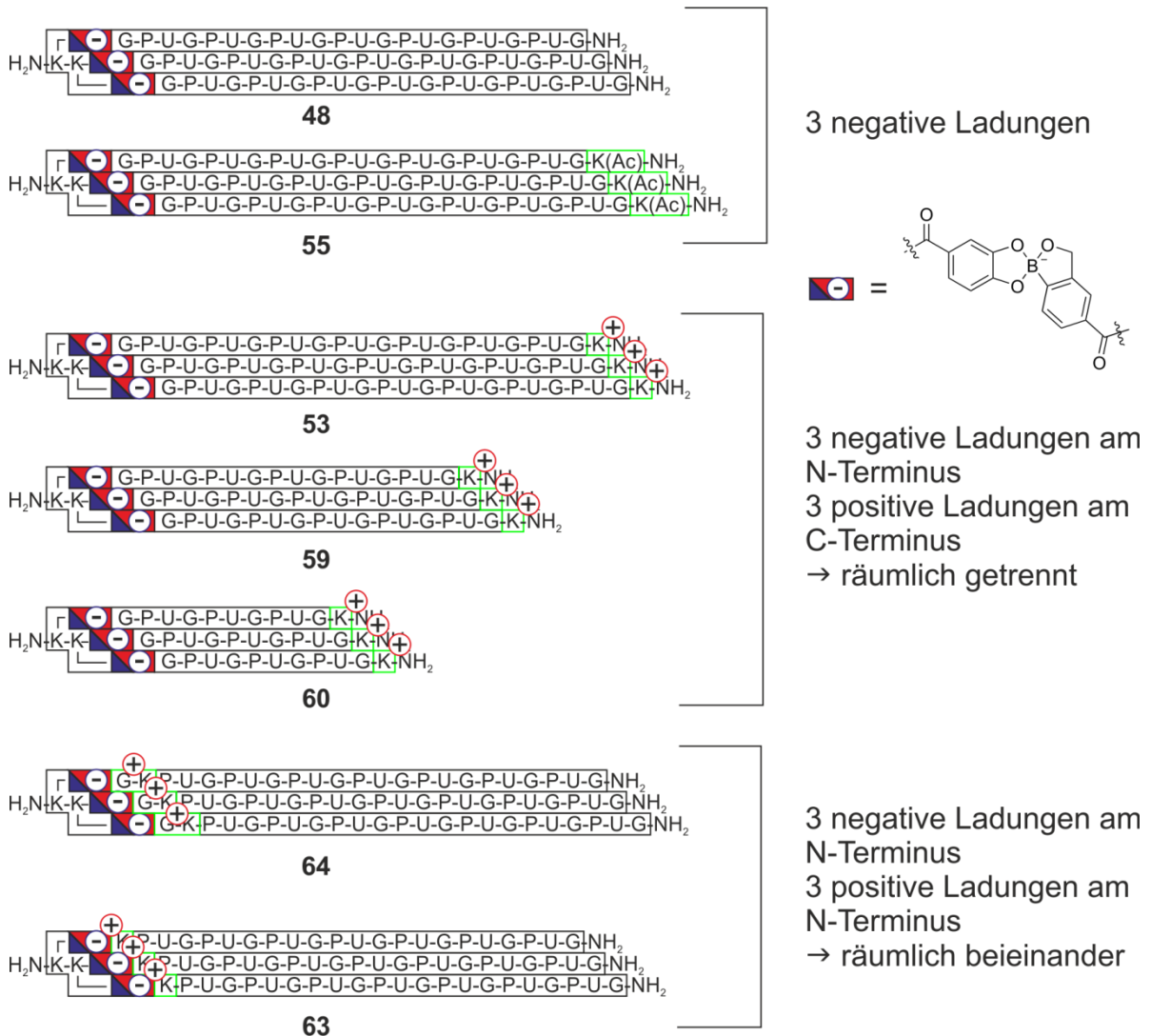


Abbildung 59: Einteilung verschiedener schematisch dargestellter *capped* Kollagen-Modellpeptide anhand der Anzahl von Ladungen und der Position innerhalb einer rigiden, tripelhelikalen Struktur. Strukturelle Abweichungen von **48** (oben) sind dabei grün markiert. Ebenfalls sind die Permanentladungen dargestellt.

Eine Untersuchung des Einflusses des *cappings* auf das Aggregationsverhalten der Verbindungen erscheint hier sinnvoller. Dazu wurde Signalintensität relativ zur Intensität bei 350 K, wobei das TSP-Signal als Referenz diente, bestimmt. Dies wurde für die jeweiligen *uncapped* Kollagen-Modellpeptide mit sieben Repetiereinheiten **37**, **52**, **54** und **61** durchgeführt und mit den beobachteten Signalintensitäten nach *capping* mit dem Lys-cap **44** für die *capped* Kollagen-Modellpeptide **37**, **55**, **63** und **64** verglichen. Es erfolgte zunächst eine Untersuchung der

ungeladenen *uncapped* bzw. dreifach negativ geladenen *capped* Kollagen-Modellpeptide (Abbildung 60).

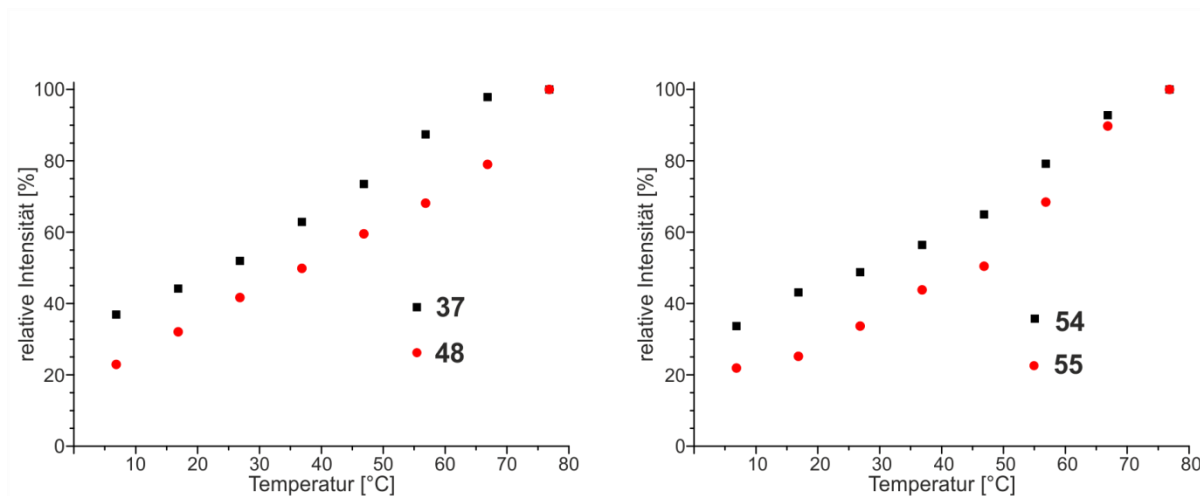


Abbildung 60: Relative Signalintensität der ungeladenen *uncapped* Kollagen-Modellpeptide **37** und **54** und die jeweiligen dreifach negativ geladenen Verbindungen **48** und **55** in Abhängigkeit der Temperatur.

Dabei ist für die ungeladenen, *uncapped* Kollagen-Modellpeptide **37** und **54** ein sehr ähnlicher Kurvenverlauf zu beobachten. Bei 280 K beträgt die relative Signalintensität etwa 35% und steigt dann kontinuierlich bis 100% bei 350 K. Ein entsprechendes *capping* zu den Verbindungen **48** und **55** lieferte bei allen Temperaturen geringere relative Signalintensitäten. Dies bedeutet, dass ein kovalent reversibles *capping* nicht nur einen Einfluss auf die Schmelztemperatur der Kollagen-Modellpeptide hat, sondern ebenfalls dazu führt, dass ein höherer Anteil in Form löslicher Aggregate vorliegt. Zwischen 7 und 47 °C ist der Effekt bei **48** und **55** ähnlich ausgeprägt, während die Aggregate von **48** bei 56 und 66 °C hingegen ein höherer Anteil aggregiert vorliegt. Der Kurvenverlauf deutet zudem auch auf eine eher unstrukturierte Aggregation hin, da kein diskreter Übergang zwischen Aggregat und Monomer (Tripelhelix bzw. Einzelstrang) zu erkennen ist. Das führt zu dem Schluss, dass eine sehr breite Größenverteilung der Aggregate vorliegen muss, welche bei verschiedenen Temperaturen desaggregieren.

Die Aggregationsneigung ist für die *capped* Kollagen-Modellpeptide mit positiver und negativer Permanentladung in räumlicher Nähe **63** und **64** hingegen deutlich ausgeprägter (Abbildung 61).

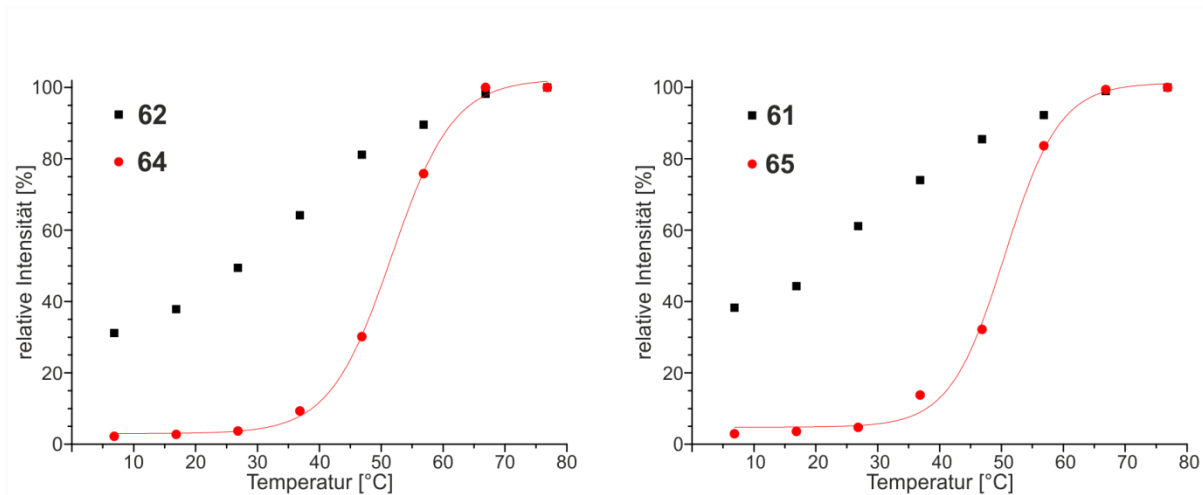


Abbildung 61: Relative Signalintensität der *uncapped* Kollagen-Modellpeptide mit positiver Permanentladung **61** und **62** und die jeweiligen *capped* Kollagen-Modellpeptide mit positiver und negativer Permanentladung in räumlicher Nähe **63** und **64** in Abhängigkeit der Temperatur. Der sigmoidale Kurvenverlauf ist durch die rote Linie dargestellt.

Während der Kurvenverlauf der *uncapped* Kollagen-Modellpeptide **61** und **62** mit denen der anderen untersuchten *uncapped* Verbindungen vergleichbar ist, zeigen die beiden Kurven für die *capped* Kollagen-Modellpeptide **63** und **64** einen ausgeprägten sigmoidalen Verlauf. Da aus dem Anstieg der relativen Signalintensität direkt eine Abnahme der aggregierten Spezies abgeleitet werden kann, ist es hier möglich, einen Schmelzpunkt dieser Spezies zu bestimmen. Für **63** liegt dieser bei 51,7 °C und für **64** bei 50,5 °C. Dass bei diesen Aggregaten überhaupt ein Schmelzpunkt zu bestimmen ist, deutet auf einen äußerst strukturierten Aufbau dieser Aggregate hin, in dem bei niedrigen Temperaturen außerdem 98% der Moleküle beteiligt sind. Die Aggregatgröße muss also eine sehr enge Verteilung aufweisen. Zwar ist eine Aggregation zu Fibrillen beschrieben, allerdings tritt eine solche Assemblierung nur bei Kollagen natürlichen Ursprungs auf.^[323–325] Für Kollagen-Modellpeptide konnte in einer detaillierten Studie gezeigt werden, dass erst für Peptide mit zehn Repetiereinheiten bei höheren Konzentrationen Aggregate beobachtet werden konnten. Für Kollagen-Modellpeptide mit sieben Repetiereinheiten konnte keine Aggregation nachgewiesen werden, während für Peptide mit acht Repetiereinheiten eine minimale Aggregation nachweisbar war.^[215] Damit stellt die hier untersuchten *uncapped* Kollagen-Modellpeptide mit einem Aggregationsgrad von etwa 60% bei 280 K eine große Ausnahme dar. Erklärt werden könnte diese hohe Aggregation mit dem N-terminalen Benzoboroxol. Anhand von Typ IV Kollagen konnte gezeigt werden, dass eine π -CH-Wechselwirkung zwischen aromatischen Seitenketten und Prolinen bzw.

Hydroxyprolinen zu einer erhöhten Aggregationstendenz führt. Jedoch konnte in derselben Studie auch gezeigt werden, dass die Verlängerung eines Kollagen-Modellpeptides mit zehn Repetiereinheiten um ein Phenylalanin hingegen eine verringerte Aggregationstendenz aufweist.^[326] Da alle beschriebenen *uncapped* Verbindungen mit verschiedenen Ladungsmustern ein ähnliches Verhalten bezüglich ihrer Aggregationstendenz aufweisen, muss auch eine Konzentrationsabhängigkeit vorliegen.

Das Verhalten der dreifach negativ geladenen *capped* Kollagen-Modellpeptide **48** und **55**, dessen Aggregation gegenüber der *uncapped* Spezies leicht erhöht (etwa 10%) ist, lässt sich dabei durch das *capping* erklären. Ein Vielzahl von Kollagen-Modellpeptide mit verknüpften Einzelsträngen sind zwar beschrieben, allerdings sind diese ausschließlich durch ihre Schmelztemperatur charakterisiert.^[23, 86, 88] Eine Beschreibung des Aggregationsverhaltens ist hingegen eine absolute Ausnahme, was eine Einordnung erschwert.^[90]

Eine nahezu quantitative Aggregation von Kollagen-Modellpeptiden ist hingegen noch nicht beschrieben. Die gilt sowohl für die unlöslichen Aggregate von **53**, als auch für die löslichen Aggregate, welche von **63** und **64** gebildet werden. Da sich die Strukturen lediglich in der Position der permanenten Ladungen an C- oder N-terminus unterscheiden, liegt es nahe, dass dies der Grund für die Bildung unlöslicher Aggregate und löslicher Aggregate mit exakt definiertem Schmelzpunkt ist.

Bei **53** ist es wahrscheinlich, dass die, innerhalb der Tripelhelix räumlich getrennten, positiven und negativen Ladungen intertripelhelikale Wechselwirkungen innerhalb der Aggregate ausbilden und damit zur extremen Stabilität beitragen.^[327] Eine Diskussion der relativen Signalintensitäten war hier durch die Niederschlagsbildung nicht möglich.

Bei **63** und **64** hingegen, werden durch die räumliche Nähe der positiven und negativen Permanentladung Aggregate gebildet, bei denen angenommen werden kann, dass sich durch den definierten Schmelzpunkt eine definierte Struktur aufweisen. Die *capped* und *uncapped* Kollagen-Modellpeptide und die relative Signalintensität bei 280 K und 300 K sind in Tabelle 12 noch einmal zusammengefasst.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 12: Relative Signalintensitäten der *uncapped* Kollagen-Modellpeptide **37**, **52**, **54**, **61** und **62** und der *capped* Kollagen-Modellpeptide **48**, **53**, **55**, **63** und **64**. Bestimmt mit TSP als Standard relativ zur Signalintensität bei 350 K.

<i>uncapped</i>	280 K	300 K	<i>capped</i>	280 K	300 K
37	36%	52%	48	23%	42%
54	34%	49%	55	22%	34%
52	28%	40%	53	n. b. ^a	n. b. ^a
61	38%	61%	63	2%	4%
62	31%	50%	64	2%	4%

^aNiederschlagsbildung

Ein kovalent reversibles *capping* kann demnach nicht nur verwendet werden um eine tripelhelikale Struktur zu stabilisieren, sondern auch um quantitativ unlösliche bzw. lösliche Aggregate zu bilden. Ein *capping* führte also in allen Fällen zu einem erhöhten Aggregationsgrad bzw. zu einer Änderung in der Größenverteilung der löslichen Aggregate. Zudem war es erstmals möglich den Schmelzpunkt einer isolierten Tripelhelix in Lösung (hier **61** und **62**) vom Schmelzpunkt eines Aggregates (hier **63** und **64**) abzugrenzen und innerhalb einer Verbindungsklasse isoliert voneinander zu betrachten (Abbildung 62).

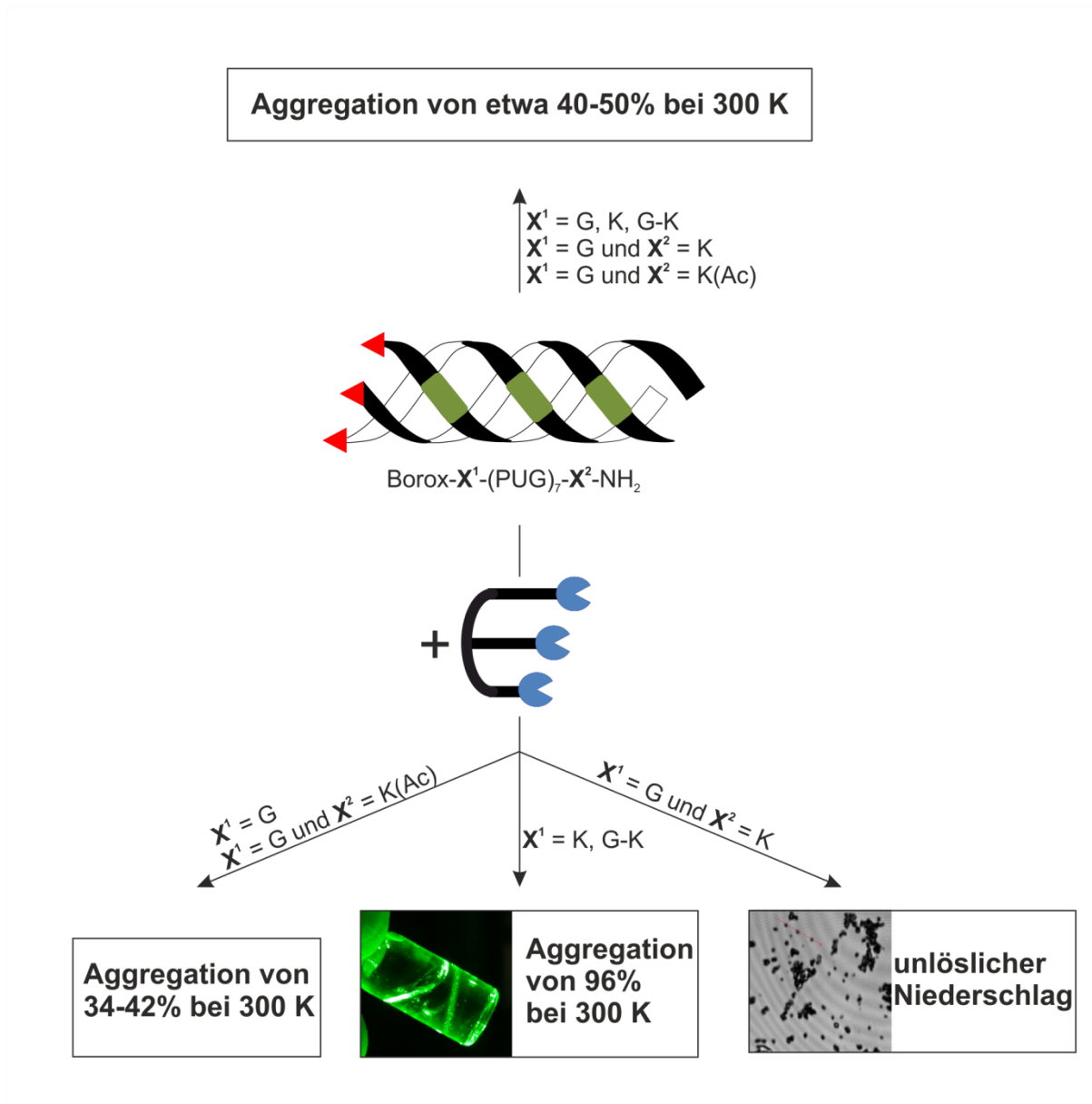


Abbildung 62: Schematische Darstellung des Aggregationsverhaltens verschiedener *capped* und *uncapped* Kollagen-Modellpeptide. Die Aggregation von allen *uncapped* Verbindungen liegt bei 300 K und einer Konzentration von 3 mM in pH = 7,4 Phosphatpuffer bei 40-50%. Ein *capping* führt hingegen zu einer Erhöhung der Aggregation um etwa 10%, zu einer nahezu quantitativen Aggregation oder zur Bildung eines unlöslichen Niederschlags, je nach Ladungsmuster.

3.3. Kieselsäurefällung mit Kollagen-Modellpeptiden

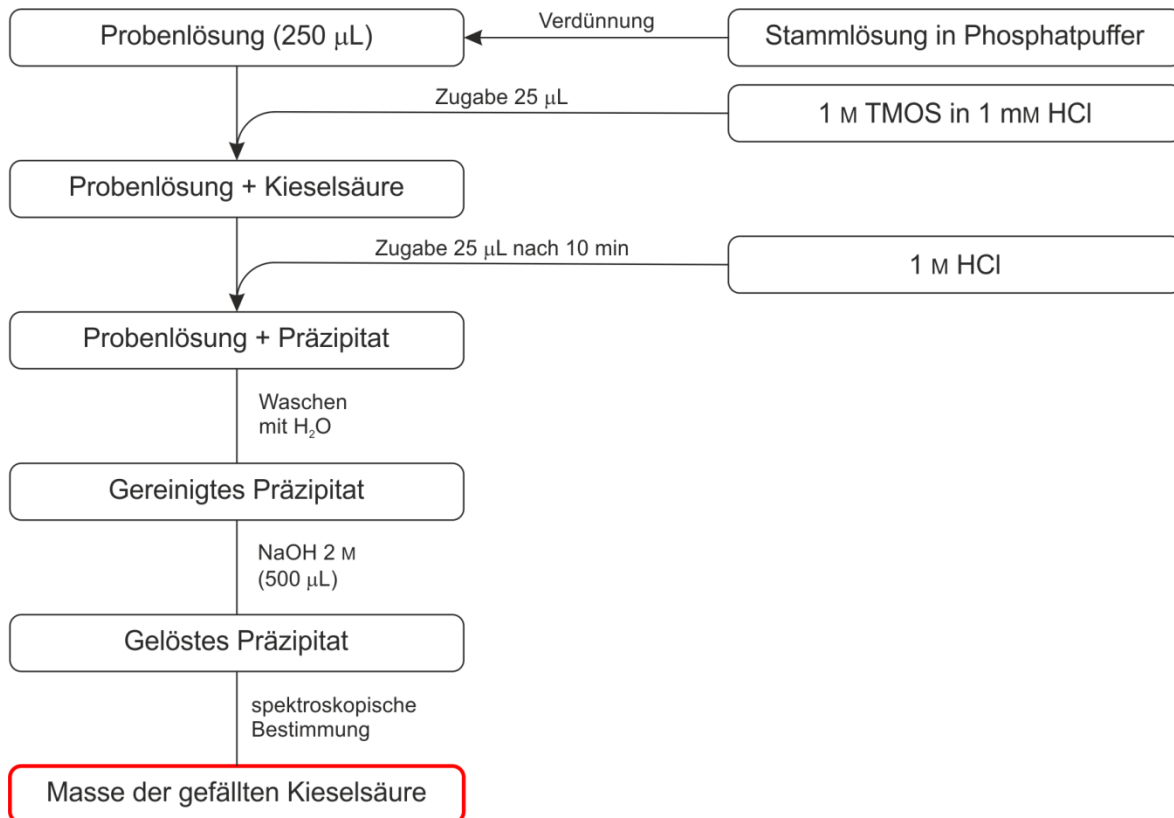
Schon in der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass sich Kollagene natürlichen Ursprungs, insbesondere Typ I Kollagene, in der Lage sind Kieselsäure zu fällen.^[96, 180, 328–330] Jedoch lässt sich durch die Mikroheterogenität der Modifikationen von natürlichem Kollagen kein direkter Zusammenhang zwischen Struktur und den Eigenschaften zur Kieselsäurefällung herstellen. Die ersten Fällungsexperimente mit löslichen synthetischen Kollagenen, in diesem Fall kovalent irreversibel *capped*

Kollagen-Modellpeptiden, wurden dabei von WEIHER durchgeführt. Diese Studien korrelierten erstmals die Anzahl kovalent verknüpfter Einzelstränge von Kollagen-Modellpeptiden mit Menge gefällter Kieselsäure.^[87] Da alle getestete Kollagen-Modellpeptide vergleichbare Strukturen der Permanentladungen aufwiesen, wurde untersucht, ob eine Erweiterung des Erklärungsmodells der Kieselsäurefällung um diesen Aspekt möglich ist. Eine Variation des Ladungsmusters und dessen Einfluss auf die Fällung stellte dabei einen vielversprechenden Ansatz dar. Auch ein Vergleich mit Verbindungen aus der Strukturklasse der Polyamine, welche ebenfalls in der Lage sind Kieselsäure zu fällen, scheint damit möglich.^[319, 320, 331, 332] Somit stehen für Fällungsexperimente eine Vielzahl von *uncapped*, kovalent reversibel und irreversibel *capped* Kollagen-Modellpeptide mit unterschiedlichen Ladungsmustern sowie ein Polyamin zur Verfügung. Dies erlaubt eine deutliche genauere Betrachtung der Struktur-Eigenschafts-Beziehung der Kieselsäurefällung

3.3.1. Das Fällungsprotokoll

Bei der Durchführung von Fällungsexperimenten wurde die Kontaktzeit zwischen Substrat und Kieselsäure als größte Fehlerquelle identifiziert. Darum wurde das etablierte Protokoll modifiziert.^[87, 168, 170] Bisher wurde nach der Zugabe der Kieselsäure zur Probe nach einer exakten Kontaktzeit der Niederschlag zentrifugiert. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass während dieser Zeit noch eine weitere Fällung von Kieselsäure stattfindet. Dies führt zu einer Ungenauigkeit in der Kontaktzeit und beeinflusst somit den Messwert. Aus diesem Grund wurde nach Ende der Kontaktzeit 1 M HCl_{aq} zugegeben, um den pH-Wert der Lösung in sauren Bereich zu bringen. Da in saurem Milieu keine Fällung von Kieselsäure mehr stattfindet, lässt sich die Kontaktzeit deutlich exakter einhalten als bisher. Der Ablauf eines solchen Fällungsexperiments ist in Schema 26 dargestellt.

Ergebnisse und Diskussion



Schema 26: Ablauf eines Fällungsexperiments. Eine Stammlösung in Phosphatpuffer wird zu 250 µL einer Probenlösung exakter Konzentration verdünnt. Die Zugabe von 1 M TMOS in 1 mM HCl startet dabei den Fällungsvorgang. Durch die Zugabe von 25 µL 1 M HCl wird die Fällung nach einer exakten Kontaktzeit von 10 min gestoppt. Zentrifugieren, Waschen des Präzipitats und anschließendes behandeln mit 2 M NaOH (500 µL) ergibt das gelöste Präzipitat. Mithilfe des Ammoniummolybdat-Verfahrens kann nur photometrisch die Menge gelöster Kieselsäure bestimmt werden, welche der Menge der gefällten Kieselsäure entspricht.

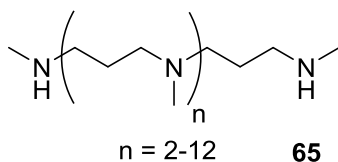
Eine abschließende photometrische Bestimmung der gelösten Menge Silica wird dann mittels Ammoniummolybdat-Methode durchgeführt.^[87, 333, 334] Dies liefert schlussendlich den Messwert für das gefällte Silica. Die Minimierung möglicher Fehlerquellen sollte sich als essentiell für die Quantifizierung der in den folgenden Kapiteln durchgeführten Fällungsexperimente herausstellen.

3.3.2. Synthetisches LCPA

Bisher wurden vor allem polykationische Verbindungen hinsichtlich ihrer Fällungseigenschaften untersucht. Dazu gehören vor allem LCPAs und polykationische Peptide wie Silaffin-1A₁ oder Polylysin.^[319, 320, 331, 332, 335] Für eine Einordnung der Fällungseigenschaften der hier untersuchten Kollagen-Modellpeptide in den Literaturkontext, war ein Vergleich mit polykationischen Verbindungen von enormer Wichtigkeit. Daher wurde das synthetische LCPA **65** hinsichtlich seiner

Fällungseigenschaften untersucht und die Menge gefällter Kieselsäure bei Konzentrationen von 100 μM und 200 μM bestimmt (Tabelle 13).

Tabelle 13: Durch das synthetische LCPA **65** gefällte Menge Kieselsäure in Abhängigkeit von der Konzentration. Durchgeführt in pH = 7,2 Phosphatpuffer und einer Kontaktzeit von 10 min. Der Fehlerbereich ist als Abweichung des Mittelwertes vom größten bzw. kleinsten Messwert angegeben.



Konzentration [μM]	Gefällte Menge Kieselsäure [μg]
100	70 \pm 5
200	132 \pm 10

Dabei fällt aus, dass eine Verdopplung der Konzentration von **65** zu einer Verdopplung der Menge gefällter Kieselsäure führt. Für den Fällungsmechanismus von synthetischen LCPA ist eine Existenz von Polyaminaggregaten postuliert. Diese führen in diesem Fall zu einer positiven Ladungsaggregation an deren Grenzfläche eine Fällung von Kieselsäure stattfinden kann.^[165, 167] Somit führt also eine Verdopplung der Konzentration zu einer Verdopplung der Oberfläche, die Größenverteilung der Aggregate muss also im hier untersuchten Konzentrationsbereich konstant sein.

Neben der Substratkonzentration lässt sich die Kieselsäurekonzentration variieren. Dabei ist vor allem die gefällte Menge Kieselsäure bei niedrigen Kieselsäurekonzentrationen von großer Bedeutung, da Monokieselsäure in Meerwasser nur in kleinsten Konzentrationen (70 μM) vorliegt und erst intrazellulär in Mikroorganismen aufkonzentriert wird.^[95, 168, 169, 336] Aus der gefällten Menge Kieselsäure lässt sich im Verhältnis zur zugegebenen Kieselsäure der Anteil der gefällten Menge bestimmen. Die so ermittelte Fällungseffizienz ist ein weiteres Charakteristikum von Verbindungen mit der Eigenschaft der Kieselsäurefällung. Je mehr der in Lösung verfügbaren Menge Kieselsäure gefällt wird, desto höher ist die Fällungseffizienz einer Verbindung. Dabei ist vor allem die Fällungseffizienz bei kleinen Kieselsäurekonzentrationen von großer Bedeutung. Für das LCPA **65** wurde eine solche Untersuchung bei einer Substratkonzentration von 100 μM durchgeführt (Abbildung 63).

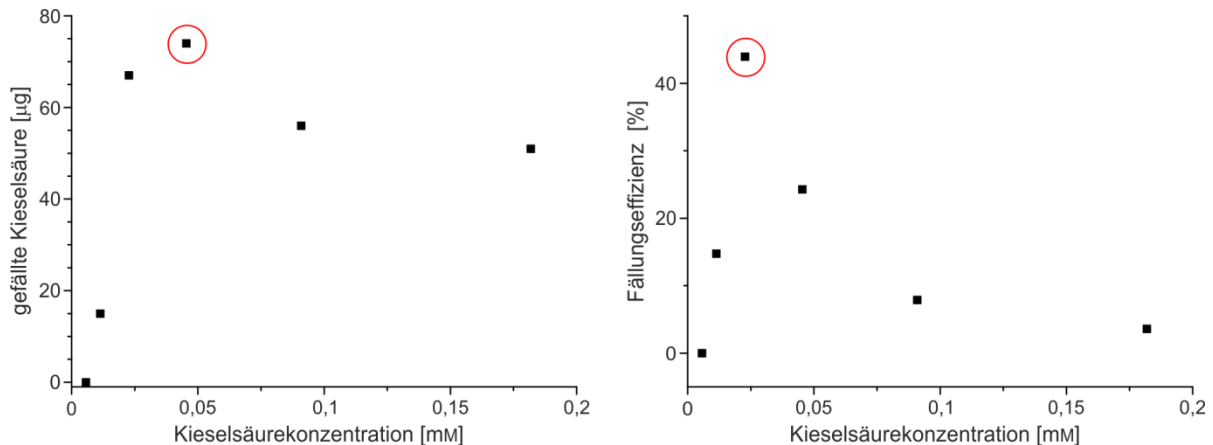


Abbildung 63: Untersuchung der Fällungsmenge und der direkt damit korrelierten Fällungseffizienz von **65** bei 100 µM Substratkonzentration in pH = 7,2 Phosphatpuffer und 10 min Kontaktzeit. **Links:** Fällungsmenge in Abhängigkeit der Kieselsäurekonzentration von **65**. **Rechts:** Daraus abgeleitet Fällungseffizienz von **65**. Maxima sind rot markiert.

Dabei ist deutlich zu erkennen, dass es eine Minimalkonzentration der Kieselsäure gibt, unterhalb derer keine Fällung mehr beobachtet werden kann. Außerdem gibt es ein Maximum der gefällten Menge Kieselsäure, welches beim LCPA **65** bei einer Kieselsäurekonzentration von etwa 0,05 mM erreicht ist. Eine weitere Erhöhung der Kieselsäurekonzentration führt zum Fällen von weniger Kieselsäure. Für die daraus abgeleitete Fällungseffizienz ergibt sich ein ähnliches Bild. Sie steigt zunächst linear an, nimmt aber nach Erreichen eines Maximums mit steigender Kieselsäurekonzentration exponentiell ab. Es fällt aus, dass sich beide Maxima unterscheiden. Während die mit 44% maximale Fällungseffizienz von LCPA **65** bei einer Kieselsäurekonzentration von 0,025 mM erreicht ist, liegt das Maximum für die gefällte Menge Kieselsäure bei einer Kieselsäurekonzentration von 0,05 mM. Eine maximale Fällungsmenge geht also nicht zwangsläufig auch mit einer maximalen Effizienz einher. Daher stellt die Fällungseffizienz einen weiteren Parameter zur Beschreibung von Fällungseigenschaften dar.

3.3.3. Kovalent irreversibel capped Kollagen-Modellpeptiden

Kovalent irreversibel capped Kollagen-Modellpeptide wurden bereits erfolgreich in der Kieselsäurefällung eingesetzt und eignen sich daher besonders, um den Einfluss der Aggregation und die Anwesenheit von Permanentladungen auf die Fällung von Kieselsäure zu untersuchen.^[87] Daher wurden die kovalent irreversibel capped

Kollagen-Modellpeptide **66** mit drei positiven Permanentladungen und **67** ohne Permanentladung betrachtet. Dazu wurde die gefällte Menge Kieselsäure in Abhängigkeit der Peptidkonzentration gemessen (Abbildung 64).

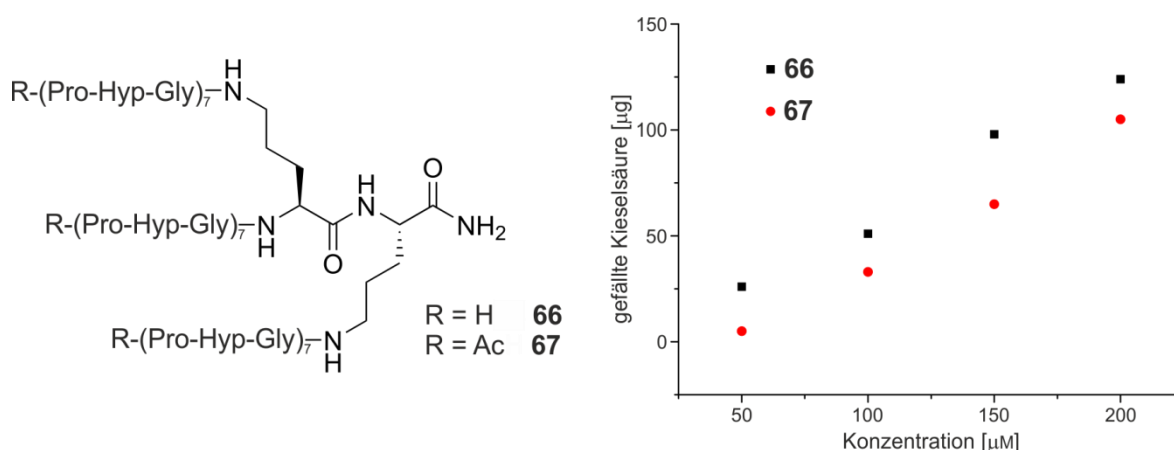


Abbildung 64: Fällungsmenge von **66** und **67** in Abhängigkeit der Peptidkonzentration in pH = 7,2 Phosphatpuffer und einer Kontaktzeit von 10 min.

Dabei ist deutlich zu erkennen, dass die gefällte Menge Kieselsäure nur in kleinem Maße vom Ladungsmuster der untersuchten Verbindungen abhängig ist. Für die Peptid **66** und **67** kann im Konzentrationsbereich zwischen 50 und 200 μM ein linearer Zusammenhang beobachtet werden, welcher auch schon von WEIHER beobachtet werden konnte.^[196] Dass auch beim ungeladenen *capped* Kollagen-Modellpeptid **67** eine Fällung beobachtet werden konnte, untermauert noch einmal das Erklärungsmodell, in welchem Kollagenaggregate in einen Fällungsmechanismus involviert sind.^[87] Allerdings wurde bisher angenommen, dass die Fällungseigenschaften dieser Verbindungsklasse unabhängig von Permanentladungen sind. Jedoch konnte anhand Verbindung **66** gezeigt werden, dass das Erklärungsmodell um den Aspekt der Permanentladungen erweitert werden muss. So führte die Anwesenheit von drei positiven Permanentladungen zu einer höheren Menge gefällter Kieselsäure. Es ist also anzunehmen, dass die Assemblierung zu hochmolekularen Aggregaten zwar als Initiator einer Kieselsäurefällung angesehen werden kann, eine Präsenz von positiven Permanentladungen allerdings die Fällungsmenge steigert. Dazu muss außerdem gegeben sein, dass die Permanentladungen an der Oberfläche der Aggregate

lokalisiert sind. Durch eine fast lineare Abhängigkeit zwischen gefällter Menge Silica und der Konzentration ist außerdem anzunehmen, dass mit höherer Konzentration die Oberfläche, an der eine Fällung stattfinden kann, vergrößert wird. Durch diese lineare Abhängigkeit muss die Anzahl der Aggregate erhöht, die Größenverteilung hingegen konstant sein.

In diesem Zusammenhang fiel eine besondere Eigenschaft des ungeladenen Peptids **67** auf. Als einzige untersuchte Verbindung war diese in der Lage bei $\text{pH} = 1$ Kieselsäure zu fällen. Bei Konzentrationen von $200\ \mu\text{M}$ und $300\ \mu\text{M}$ konnten $22\ \mu\text{g}$ bzw. $31\ \mu\text{g}$ Silica gefällt werden. Dies ist zwar deutlich weniger als bei $\text{pH} = 7,2$, allerdings ist dies die erste Verbindung, welche überhaupt in der Lage ist, unter diesen Bedingungen Kieselsäure zu fällen. Dies kann damit erklärt werden, dass eine Änderung des pH-Wertes durch die fehlenden Permanentladungen keinen Einfluss auf die Aggregatstruktur hat.

Anhand der dreifach positiv geladenen Verbindung **66** ebenfalls eine Untersuchung der Fällungseffizienz durchgeführt (Abbildung 65).

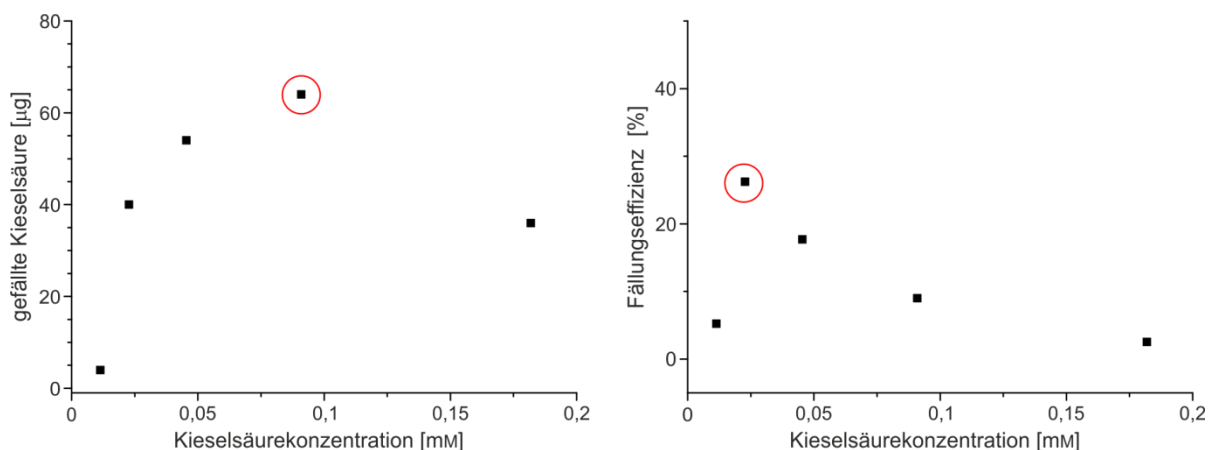


Abbildung 65: Untersuchung der Fällungsmenge und der direkt damit korrelierten Fällungseffizienz von **66** bei $100\ \mu\text{M}$ Substratkonzentration in $\text{pH} = 7,2$ Phosphatpuffer und 10 min Kontaktzeit. **Links:** Fällungsmenge in Abhängigkeit der Kieselsäurekonzentration von **66**. **Rechts:** Daraus abgeleitet Fällungseffizienz von **65**. Maxima der Kurven sind rot markiert.

Deutlich zu erkennen ist ein Kurvenverlauf, welcher auch schon bei LCPA **65** beobachtet werden konnte. Allerdings liegt die zur Kieselsäurefällung notwendige Mindestkonzentration von Kieselsäure höher als bei LCPA **65** und auch eine maximale Fällungsmenge wird erst bei höheren Kieselsäurekonzentrationen erreicht.

Bei der Fällungseffizienz ergibt sich ein ähnliches Bild. Zwar wird sowohl bei LCPA **65**, als auch bei Kollagen-Modellpeptid **66** eine maximale Fällungseffizienz bei einer Kieselsäurekonzentration von 0,025 mM erreicht. Diese fällt mit 26% für **66** allerdings deutlich geringer aus. Für weitere Untersuchungen an Kollagen-Modellpeptiden stellte sich eine Kieselsäurekonzentration von 0,09 mM allerdings als optimal heraus, da hier die Fällungsmenge am größten war.

3.3.4. Ungeladene Kollagen-Modellpeptide mit unterschiedlichem Hydroxylierungsgrad

Eine Untersuchung von der Kollagen-Modellpeptide Ac-(Pro-Hyp-Gly)₇-NH₂ (**8**) und Ac-(Pro-Hyp-Gly)₃-Pro-Dyp-Gly-(Pro-Hyp-Gly)₃-NH₂ (**29**) hinsichtlich ihrer Fällungseigenschaften erschien sinnvoll, da von EHRICH *et al.* gezeigt werden konnte, dass in Glass-Schwämmen (*Hyalonema sieboldi*) Kieselsäure an Kollagen gefällt wird.^[95] Dieses Kollagen weist einen ungewöhnlichen hohen Hydroxylierungsgrad durch 3-Hyp in Xaa-Position auf. Außerdem konnte ein hoher Anteil an hydroxylierten Prolinen (3-Hyp, 4-Hyp und Dyp) in Zellwänden von Diatomeen nachgewiesen werden, was die Beteiligung an einer Kieselsäurefällung wahrscheinlich macht.^[173–175, 337] Eine Untersuchung der Fällungseigenschaften führte jedoch zu dem Ergebnis, dass keine der beiden Verbindungen **8** und **29** in der Lage war Kieselsäure zu Fällen (Tabelle 14).

Tabelle 14: Gefällte Menge Kieselsäure der Kollagen-Modellpeptide **8** und **29** bei pH = 7,2, 10 min Kontaktzeit und Substratkonzentrationen von 100, 400 und 1000 µM.

Verbindung	Gefällte Menge bei 100 µM	Gefällte Menge bei 400 µM	Gefällte Menge bei 1000 µM
8	<5 µg ^a	<5 µg ^a	<5 µg ^a
29	<5 µg ^a	<5 µg ^a	<5 µg ^a

^aMesswert liegt unterhalb der Nachweisgrenze von 5 µg

Der höhere Hydroxylierungsgrad von **29** ist demnach nicht alleine ausreichend, um eine Fällung zu ermöglichen. Im bisherigen Kontext stellt dies allerdings keine Ausnahme dar. Bereits von WEIHER konnte gezeigt werden, dass auch ein Kollagen-Modellpeptid mit sieben Repetiereinheiten, welches an N- und C-Terminus je eine positive bzw. negative Permanentladung aufweist, nicht in der Lage war Silica zu

fällen.^[87] Interessant ist jedoch, dass sowohl **8** als auch **29** einen Intensitätsverlust im ¹H-NMR-Spektrum aufweisen, was auf die Bildung von Aggregaten hindeutet. Diese Aggregatbildung liegt dabei in dem Bereich, der auch für andere *uncapped* Kollagen-Modellpeptide beobachtet werden konnte (Vgl. Kapitel 3.2.6.4.).

Das legt den Schluss nahe, dass nicht allein die Ausbildung von Aggregaten eine Kieselsäurefällung ermöglicht, sondern die Struktur, wie beispielsweise Größe oder Oberfläche, ebendieser von entscheidender Bedeutung ist. Allerdings war mit NMR-spektroskopischen Methoden nur eine Bestimmung des aggregierten Anteils, nicht aber dessen Struktur, möglich. Es liegt aber nahe, dass ein kovalent irreversibles *capping* der tripelhelikalen Struktur nicht nur dessen Schmelzpunkt, sondern auch die Aggregation gegenüber eines *uncapped* Kollagen-Modellpeptids beeinflusst und damit einen starken Einfluss auf die Eigenschaft zu Kieselsäurefällung hat. Für das kovalent reversible *capping* konnte dies in Kapitel 3.2.6.4. bereits gezeigt werden.

3.3.5. Einfluss eines kovalent reversiblen *cappings*

Die bereits in Kapitel 3.2.6.4. beschriebene Einteilung von kovalent reversibel *capped* Kollagen-Modellpeptiden wurde verwendet um einen Zusammenhang zwischen Menge gefällter Kieselsäure und Ladungsmuster herzustellen. Dabei wurde vor allem zwischen Verbindungen mit und ohne positive Permanentladungen unterschieden.

Eine Untersuchung des Benzoboroxol-modifizierten Kollagen-Modellpeptids ohne positive Permanentladung **37** und seinem *capped* Analogon **48** hinsichtlich ihrer Fällungseigenschaften führte zum Ergebnis, dass sowohl *uncapped*, als auch *capped* Kollagen-Modellpeptid nicht in der Lage waren Kieselsäure zu Fällern (Tabelle 15).

Tabelle 15: Gefällte Menge Kieselsäure der Kollagen-Modellpeptide **37** und **48** bei pH = 7,2, 10 min Kontaktzeit und Substratkonzentrationen von 100, 400 und 1000 µM.

Verbindung	Gefällte Menge bei 100 µM	Gefällte Menge bei 400 µM	Gefällte Menge bei 1000 µM
37	<5 µg ^a	<5 µg ^a	<5 µg ^a
48	<5 µg ^a	<5 µg ^a	<5 µg ^a

^aMesswert liegt unterhalb der Nachweisgrenze von 5 µg

Für die *uncapped* Verbindung **37** war dies im Hinblick auf die fehlende Eigenschaft der Kieselsäurefällung der ungeladenen, *uncapped* Kollagen-Modellpeptide **8** und **29** (vgl. Kapitel 3.3.2.) zu erwarten. Für die *capped* Verbindung **48**, welche eine, im Vergleich zu **37**, erhöhte Tendenz zur Aggregation aufweist (vgl. Kapitel 3.2.6.4.), scheint der Einfluss der negativen Ladungen der Boronate einen erheblichen Einfluss auf die Fällungseigenschaften zu haben. Eine Aggregation von **48** führt demnach zwangsläufig zu einer Aggregation negativer Ladung, welche einen erheblichen Effekt auf die Struktur der Aggregate haben sollte.^[338] Eine Phasenseparation zusammen mit den Phosphatanionen ist durch das negativ geladene Aggregat ebenfalls nicht möglich.^[331, 339] Einen Einfluss auf die Bindung zwischen *cap* und Tripelhelix durch die Zugabe von Kieselsäure konnte mittels NMR-spektroskopischer Methoden ausgeschlossen werden, wobei sich ebenfalls zeigte, dass auch bei einer Substratkonzentration von 3 mM keine Kieselsäurefällung auftritt.

Die beiden positiv geladenen *uncapped* Kollagen-Modellpeptide **61** und **62** mit N-terminaler Borox-K- bzw. Borox-G-K-Einheit, sowie **52** mit C-terminalem Lysin zeigten oberhalb einer Konzentration von 500 μM Fällungseigenschaften (Tabelle 16).

Tabelle 16: Gefällte Menge Kieselsäure der Kollagen-Modellpeptide **52**, **61** und **62** bei pH = 7,2, 10 min Kontaktzeit und Substratkonzentrationen von 500 und 1000 μM . Der Fehler der Messwerte vom Mittelwert betrug in allen Fällen <5 μg .

Verbindung	Gefällte Menge bei 500 μM	Gefällte Menge bei 1000 μM
52	67 μg	n.b.
61	86 μg	155 μg
62	125 μg	284 μg

Da der einzige Unterschied zu **37** eine zusätzliche positive Ladung ist, scheint dies für die beobachteten Fällungseigenschaften essenziell zu sein. Eine Aggregation, welche mit den anderen *uncapped* Verbindungen vergleichbar ist (Vgl. Kapitel 3.2.6.4.), führt in diesem Fall auch zu einer Aggregation von positiven Ladungen, welche, ähnlich zu Polyaminen, eine Fällung von Kieselsäure ermöglicht.^[340–342] Da das Verhältnis von Masse zu Ladung bei Polyaminen deutlich geringer ist, erklärt

auch die deutlich höheren Minimalkonzentrationen von **52**, **61** und **62** welche für eine Kieselsäurefällung notwendig sind. Die Unterschiede zwischen den verschiedenen *uncapped* Kollagen-Modellpeptide muss sich demnach mit Unterschieden in der Aggregatstruktur erklären lassen, welche dazu führen, dass an der Aggregatoberfläche die Ladungsstruktur der Lysinseitenketten unterschiedlich ausgeprägt ist. Ein vergleichbarer Einfluss der Ladungsstruktur auf die Fällung von Kieselsäure konnte auch schon für Polyamine, welche in Anzahl positiver Permanentladungen und im Abstand zwischen diesen variiert wurden, beobachtet werden.^[319, 343, 344] Demnach ist für diese Verbindungsklasse ein Zusammenspiel zwischen Aggregation der tripelhelikalen Struktur und der damit verbundenen Aggregation von positiven Permanentladungen für die Fällung von Kieselsäure ursächlich. Das Kollagen-Modellpeptid Borox-G-(PUG)₃-K-NH₂ (**57**), welche keines Tripelhelix und damit auch keine Aggregate bildet, zeigte keine Fällungseigenschaften und lässt sich damit ebenfalls in das Erklärungsmodell einbeziehen.

Ein *capping* der Verbindungen **52**, **61** und **62** zeigte jedoch eine Änderung in der Eigenschaft der Kieselsäurefällung. Während die *capped* Kollagen-Modellpeptiden **63** und **64** in der Lage waren, Kieselsäure zu fällen, war dies beim unlöslichen Niederschlag **53** nicht der Fall (Tabelle 17).

Tabelle 17: Gefällte Menge Kieselsäure der *capped* Kollagen-Modellpeptide **63** und **64** bei pH = 7,2, 10 min Kontaktzeit und Substratkonzentrationen von 500 und 1000 µM. bezogen auf den verwendeten Einzelstrang. Die Konzentration der Tripelhelikalen Spezies liegt also bei 167 und 333 µM. Der Fehler der Messwerte vom Mittelwert betrug in allen Fällen <5 µg.

Verbindung	Gefällte Menge bei	
	500 µM	1000 µM
63	92 µg	107 µg
64	123 µg	264 µg

Dabei fällt auf, dass die, bei einer Substratkonzentration von 500 µM, gefällte Menge Kieselsäure der *capped* Verbindungen **63** und **64** im Bereich der gefällten Menge von den jeweiligen *uncapped* Verbindungen **61** und **62** liegt. In diesem Zusammenhang muss erwähnt werden, dass sich die Konzentrationsangaben auf den eingesetzten Einzelstrang beziehen, die Konzentration der *capped* Verbindungen liegen entsprechend bei 167 und 333 µM wobei der aus Gründen der

Übersicht, nur der Wert für die Einzelstrangkonzentration verwendet wurde. Hier scheinen zwei gegensätzliche Effekte zum Tragen zu kommen. Zum einen sollten die Aggregate der *capped* Verbindungen deutlich strukturierter sein und eine schmale Größenverteilung aufweisen, was einen positiven Einfluss auf die Fällung haben sollte. Zum anderen führen die gebildeten Boronate zu einer zwitterionischen Struktur, welche durch die relative Nähe zu den positiven Permanentladungen einen negativen Effekt auf die Fällungseigenschaften haben sollte. Bei einer Substratkonzentration von 500 μM scheinen sich der positive Beitrag durch die Aggregation und der negative Beitrag durch die Boronate auszugleichen. Erst bei einer Substratkonzentration von 1000 μM lassen sich für die *capped* Verbindungen schlechtere Fällungseigenschaften als für die jeweiligen *uncapped* Verbindungen beobachten. Das die Verschlechterung bei **64** weniger deutlich ausfällt, kann mit dem zusätzlichen Glycin zwischen Benzoboroxol und Lysin (Borox-G-K-) erklärt werden, also dem erhöhten Abstand zwischen positiver und negativer Permanentladung.

3.3.6. Einfluss von Ladung und Aggregation

In den durchgeführten Fällungsexperimenten konnte gezeigt werden, dass entweder keine Kieselsäure gefällt wurde, oder sich die, durch die Verbindungen mit unterschiedlicher Ladungsstruktur, gefällte Menge Kieselsäure, nicht signifikant unterschied. Daher stellt sich die Frage, inwieweit eine Beschreibung der Fällungseigenschaften durch der Menge gefällter Kieselsäure sinnvoll ist. Vielmehr sollte grundsätzlich zwischen der Fähigkeit zur Kieselsäurefällung und dem Fehlen ebendieser unterschieden werden. Erst ein breiteres Verständnis über die Parameter, welche für die Fällungseigenschaften ursächlich sind, ermöglicht die Optimierung von Kollagen-Modellpeptide hinsichtlich ihrer Fällungseigenschaften.

Da die Fähigkeit zur Kieselsäurefällung nicht allein einer Aggregation oder positiven Permanentladungen zugeschrieben werden kann, scheint eine Einteilung anhand der Kombination dieser Kriterien sinnvoll. Dabei kann für die Aggregation zwischen der Bildung von keinen Aggregaten, der Bildung von unstrukturierten Aggregaten und der Bildung von strukturierten Aggregaten. Zwischen strukturierten und unstrukturierten Aggregaten lässt sich insoweit unterscheiden, als das sich für das temperaturabhängige Auflösen von strukturierten Aggregaten ein kooperatives

Ergebnisse und Diskussion

Verhalten beobachten lässt und somit ein Schmelzpunkt ebendieser zu ermitteln ist (Vgl. Kapitel 3.2.6.4). Für unstrukturierte Aggregate ist dies nicht der Fall. Strukturierte Aggregate haben also eine schmale Größenverteilung, während unstrukturierte Aggregate eine breite Größenverteilung aufweisen. Für die Ladung auf der anderen Seite lässt sich zwischen neutral, bzw. negativ oder positiv geladen unterscheiden. Die sich daraus ergebende Einteilung ist in Abbildung 66 zu sehen.

positive Permanentladung	57	52, 61, 62, 65, 66	63, 64
neutral		67 8, 29, 37	63, 64
negative Permanentladung		48	
	keine Aggregation	Breite Größenverteilung der Aggregate	Schmale Größenverteilung der Aggregate

Abbildung 66: Einteilung der verschiedenen untersuchten Verbindungen hinsichtlich ihrer Eigenschaft zur Kieselsäurefällung anhand von Ladung und Aggregation. In roten Quadranten wurde keine Kieselsäurefällung festgestellt. In grünen hingegen war diese Eigenschaft zu beobachten. Für den gelben Quadranten gibt es bis zum jetzigen Zeitpunkt keine Beispiele.

Deutlich zu sehen ist, dass ohne eine Aggregation auch keine Fällungseigenschaften zu beobachten waren bzw. zu erwarten sind. Auch eine positive Permanentladung hat keinen Einfluss darauf (**57**). Für Verbindungen, welche unstrukturierte Aggregate bilden ist hingegen die Ladungsstruktur von entscheidender Bedeutung. Während **53** mit drei negativen Permanentladungen keine Fällungseigenschaften aufweist, sind die Verbindungen mit positiven

Permanentladungen (**52**, **61**, **62** und **66**) in der Lage Kieselsäure zu fällen. Auch das synthetische LCPA **65** lässt sich hier einordnen. Ungeladene Verbindungen, welche unstrukturierte Aggregate ausbilden, stellen hier allerdings eine Besonderheit dar. Hier kann die Fähigkeit zur Kieselsäurefällung nicht eindeutig zugeordnet werden. Die *uncapped* Kollagen-Modellpeptide **8** und **29** waren nicht in der Lage Kieselsäure zu fällen, während das kovalent irreversibel *capped* Kollagen-Modellpeptid **67** dazu in der Lage war. Verbindungen, welche strukturierte Aggregate bilden waren hingegen in der Lage Kieselsäure zu fällen. Dabei ergibt sich allerdings die Besonderheit, dass sich **63** und **64** durch ihren zwitterionischen Charakter sowohl als ungeladen, also keine Nettoladung, als auch unter „positive Permanentladung“ einordnen lassen, da ein Einfluss der positiven Permanentladung auf die Fällungseigenschaften nicht ausgeschlossen werden kann. Es ist zwar nicht davon auszugehen, dass diese für die Fällungseigenschaften ursächlich sind, allerdings ist wahrscheinlich, dass sie die Fällungsmenge beeinflussen (Vgl. Kapitel 3.3.4.). Für eine Kombination aus einer strukturierten Aggregation und negativer Permanentladungen ist hingegen kein Beispiel bekannt, sodass Fällungseigenschaften für solche Verbindungen nichts ausgeschlossen werden können.

Somit konnte erstmals eine Korrelation zwischen Aggregationsverhalten und Ladungsstruktur von Kollagen-Modellpeptiden hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Kieselsäurefällung hergestellt werden. Sogar die Verbindungsklasse der Polyamine lässt sich darin einordnen. Der Aufbau der Aggregate stellt allerdings einen Parameter dar, bei dem nur zwischen strukturiert, also dem kooperativem lösen des Aggregats, und unstrukturiert unterschieden werden kann. Eine genaue Kenntnis über die Größenverteilung der Aggregate würde die Möglichkeit bieten, eine deutlich genauere Einteilung der Verbindungen bzw. die Abgrenzung untereinander zu erreichen.

4. Zusammenfassung

In dieser Arbeit war es möglich mit synthetischen Modellpeptiden das Wissen um den Einfluss von PTMs an Kollagenen zu erweitern, sowie grundlegende Kenntnisse zur supramolekularen Aggregation zu gewinnen. Mit einer optimierten Festphasenpeptidsynthese, basierend auf der Kupplung von Tripeptid-Bausteinen, war es möglich Kollagen-Modellpeptide in deutlich höheren Ausbeuten, bei gleichzeitig reduziertem Einsatz von Tripeptid-Bausteinen, darzustellen. Da eine Kupplung von 3,4-Dihydroxyprolin mit großen Problemen verbunden ist, wurde ein 3,4-Dehydroprolin-Baustein in der Synthese der Kollagen-Modellpeptide eingesetzt, was eine Dihydroxylierung an einem späteren Zeitpunkt der Synthese ermöglichte. Anhand von 3,4-Dehydroprolin-modifizierten Ausschnitten aus der Aminosäuresequenz von Kollagen-Modellpeptiden konnte gezeigt werden, dass die Diastereoselektivität der Dihydroxylierung mit der Peptidlänge skaliert. Es war demnach möglich das 3,4-Dehydroprolin eines vollständig assemblierten Kollagen-Modellpeptids selektiv zum 3,4-Dihydroxyprolin zu dihydroxylieren. Da eine Umsetzung der tripelhelikalen Struktur keinen vollständigen Umsatz lieferte, waren Temperaturen oberhalb der Schmelztemperatur notwendig. Diese *late-stage* Dihydroxylierung ließ sich zudem auf ein 3,4-Dehydroprolin-modifiziertes Gramacidin S-Derivat übertragen, welches hinsichtlich seiner antimikrobiellen und hämolytischen Eigenschaften ein verbessertes biologisches Profil im Vergleich zum Wildtyp aufwies (Tabelle 11).

Die Schmelzpunktbestimmung konnte zudem mittels temperaturabhängiger ^1H -NMR-Spektroskopie realisiert werden, wobei die Signale der δ -Protonen der Proline, welche in tripelhelikaler Umgebung eine Hochfeldverschiebung aufweisen, genutzt wurden. Dadurch konnte nicht nur das Zwei-Zustand-Modell bestätigt werden, welches für die Faltung bzw. Entfaltung von Kollagen-Modellpeptiden angenommen wird, sondern ergänzend dazu gezeigt werden, dass es einen maximalen Anteil an tripelhelikal assembliertem Kollagen-Modellpeptid von etwa 80% gibt, wobei dieser, je nach Peptid, variieren kann. Außerdem war eine Quantifizierung der Aggregation möglich, indem die Signalintensität relativ zu einem TSP-Standard in Abhängigkeit der Temperatur bestimmt wurde.

Zusammenfassung

Es ist im Rahmen dieser Arbeit außerdem gelungen, das erste kovalent reversibel verknüpfte (*capped*) Kollagen-Modellpeptid darzustellen. Dazu wurde ein Benzoboroxol-modifizierter Einzelstrang synthetisiert, welcher dann mit einem dreifach Catechol-modifizierten Dipeptid (*cap*) in Lösung zur *capped* Tripelhelix assemblierte, was ebenfalls als *late-stage* Modifikation aufgefasst werden kann. NMR-Spektroskopische Untersuchungen zeigten, dass ein *cap* selektiv an eine Tripelhelix bindet. Dies stellt auch das erste Beispiel einer quantitativen Veresterung von Boroxol in wässriger Lösung dar. Außerdem konnte gezeigt werden, dass dieses kovalent reversible *capping* die Schmelztemperatur der Tripelhelix erhöht, allerdings weniger stark als durch eine kovalent irreversible Verknüpfung.

Eine Modifikation hinsichtlich der Ladungsstruktur durch das N- bzw. C-terminale Verlängern der Sequenz um ein Lysin zeigte ohne *cap* keinen signifikanten Einfluss auf die Eigenschaften. Durch ein *capping* jedoch wurde eine zwitterionische Ladungsstruktur, bestehend aus dem gebildeten Boronat und dem Ammonium der Lysin-Seitenkette, erzeugt. Bei benachbarten positiven und negativen Ladungen bildeten sich lösliche Aggregate, welche einen definierten Schmelzpunkt und damit eine enge Größenverteilung aufwiesen. Bei getrennten positiven und negativen Ladungen hingegen bildeten sich unlösliche Aggregate, welche erst bei Temperaturen in Lösung gingen die deutlich höher waren, als die Schmelztemperaturen der entsprechenden *uncapped* Tripelhelices. Außerdem war es möglich einen Niederschlag mit einem Kollagen Modell Peptid mit drei Repetiereinheiten, welcher *uncapped* keine Tripelhelix ausbildet, zu erzeugen. Eine Modulation der Größenverteilung der Aggregate durch die Ladungsstruktur war also möglich.

Die Untersuchung der verschiedenen Kollagen Strukturen hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Kieselsäurefällung lieferte das Ergebnis, dass lediglich kovalent irreversibel *capped* Kollagen-Modellpeptide und kovalent reversible *capped* Kollagen-Modellpeptide, welche positive Permanentladungen aufweisen, über Fällungseigenschaften verfügen. Eine Aggregation konnte zudem als notwendiges Kriterium für die Kieselsäurefällung ausgemacht werden. Allerdings hat auch Ladungsstruktur einen großen Anteil daran. Während Verbindungen mit negativer Permanentladung nicht in der Lage sind Kieselsäure zu fällen, sind sämtliche Verbindungen, welche Aggregation in Kombination mit positiven Permanentladungen

Zusammenfassung

aufweisen dazu in der Lage. Für Verbindungen mit strukturierter Aggregation, also einer engen Größenverteilung der Aggregate, gilt dies auch bei Zwitterionischen Verbindungen. Somit lässt sich die Fähigkeit zur Kieselsäurefällung von Kollagen-Modellverbindungen auf die Aggregation und die Ladungsstruktur eingrenzen, wobei sich auch andere Verbindungen mit kieselsäurefällenden Eigenschaften problemlos in dieses Erklärungsmodell einordnen ließen.

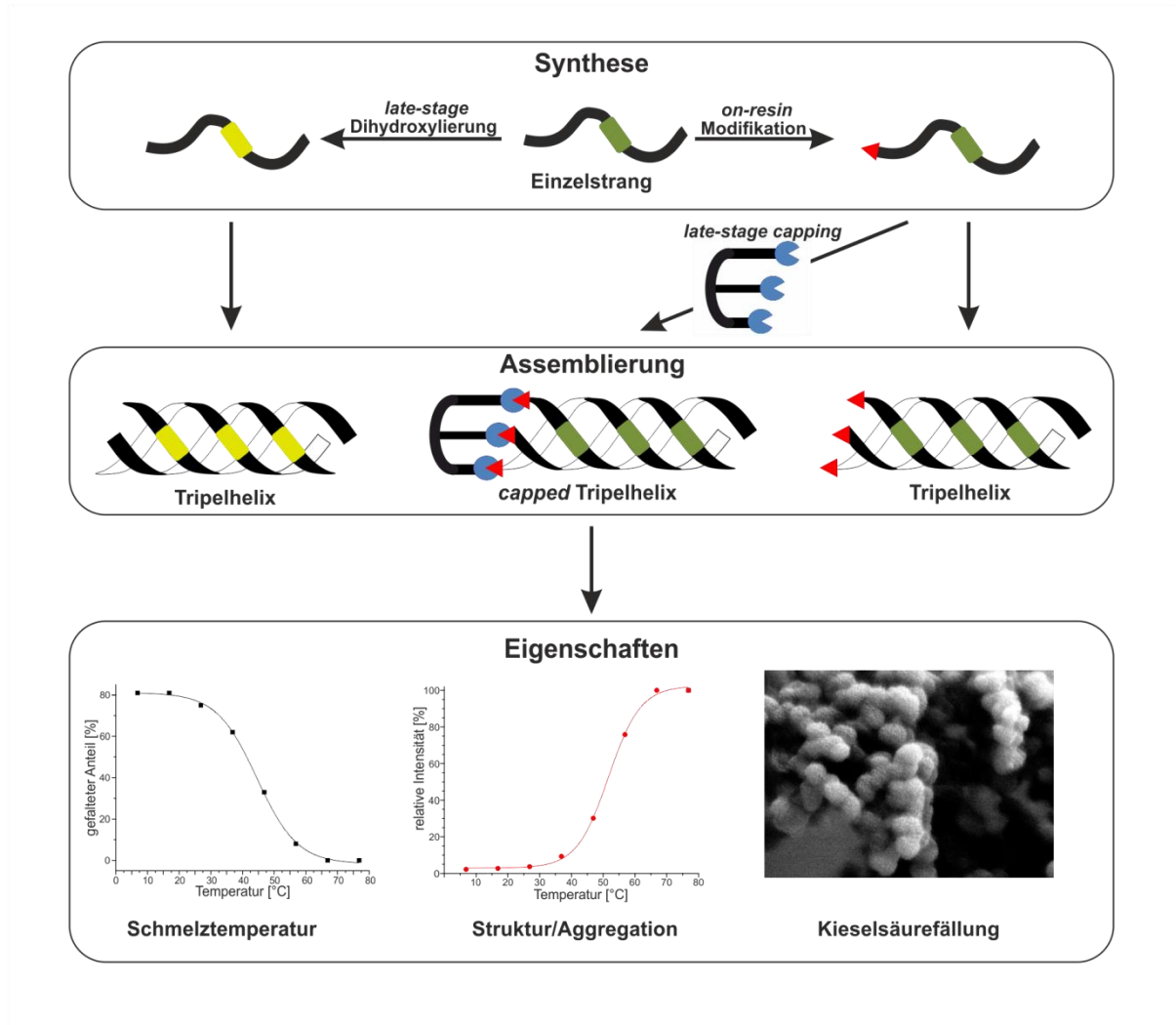
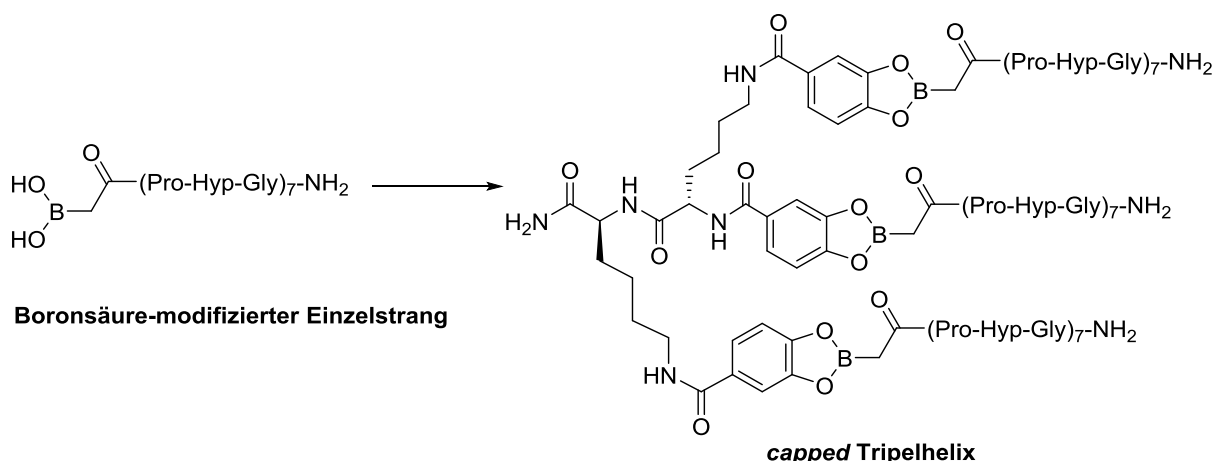


Abbildung 67: Darstellung der modifizierten Kollagen-Modellpeptide. Eine Assemblierung der Kollagen Einzelstränge in Lösung führt zu einer tripelhelikalen Struktur. Zusammen mit einem geeigneten *cap* bildet sich die *capped* Tripelhelix erst kooperativ in Lösung. Eine Analyse hinsichtlich Schmelztemperatur, Struktur und Aggregation erfolgt mittels NMR-spektroskopischer Methoden.

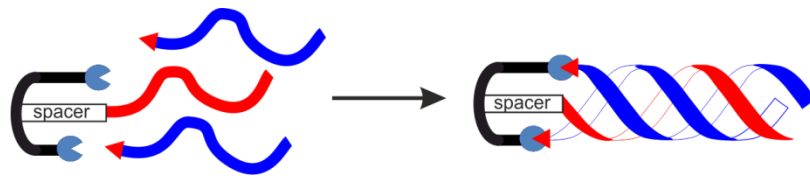
5. Ausblick

Auf der Basis effizienter Synthesen von Kollagen-Modellpeptiden lassen sich Verbindungen mit spezifischer supramolekularer Aggregation darstellen und in der materialwissenschaftlichen Forschung einsetzen. In zukünftigen Arbeiten könnte versucht werden, den Boroxol-Linker strukturell zu vereinfachen. Ein erster Ansatz wäre hierbei die Verwendung von einfachen Boronsäuren. Zwar weisen Boronsäuren im Vergleich zu Boroxolen in wässriger Lösung deutlich schlechtere Eigenschaften der Diolbindung auf, allerdings ist auch hier denkbar, dass eine dreifache Veresterung der Tripelhelix zu vollständigem Umsatz führt. Die Verwendung von Boronsäuren hätte zudem weitere Vorteile. Zum einen hat sie im Vergleich zu Boroxol einen deutlich geringeren sterischen Anspruch, zum anderen weist der so gebildete Ester keine negative Permanentladung auf (Schema 27).



Schema 27: Bildung einer capped Tripelhelix aus einem Boronsäure-modifiziertem Einzelstrangs.

Ein weiterer denkbarer Ansatz für zukünftige Arbeiten ist eine Kombination aus kovalent reversiblen und kovalent irreversiblen Verknüpfen von Kollagen Einzelsträngen. Dazu kann ein Einzelstrang mit dem *cap* irreversibel verknüpft werden und die beiden anderen Einzelstränge reversibel. Dies würde sowohl die Bildung von Heterotrimeren, also auch eine genaue Kontrolle des Registers der Tripelhelix ermöglichen. Diese Kontrolle über *leading*, *middle* und *lagging strand* ließe sich dann beispielsweise für das selektive Adressieren von Proteinen nutzen (Schema 28).^[345]



Schema 28: Bildung eines Heterotrimer. Mit der Wahl des *spacers* ließe sich das Register steuern.

6. Summary

In this work, collagen model peptides were utilized to gain fundamental knowledge about the influence of PTMs and behavior in the supramolecular aggregation. CMPs were synthesized with fragment condensation of adequately protected tripeptide building blocks according to an optimized SPPS-protocol. This resulted in higher yields and less amounts of building blocks compared to established procedures. Because a coupling of 3,4-dihydroxyproline is prone to several problems, 3,4-dehydroproline was used in the synthesis and dihydroxylated subsequently. The diastereoselectivity of the dihydroxylation of 3,4-dehydroproline containing extracts from the collagen-sequence scales with peptide length. A dihydroxylation of a fully assembled collagen model peptide was performed without formation of another diastereomer but required temperatures above the melting point of the triple helix due to incomplete conversion below this temperature. This late-stage dihydroxylation was successfully transferred to a 3,4-dehydroproline modified gramicidin S derivative. The dihydroxylated GS derivative showed an improved biological profile in comparison to the wild type (Table 11).

The determination of the melting point was performed with temperature dependent ^1H -NMR-spectroscopy by exploiting the highfield shift of the proline- δ -protons in triple helical environment. This underlined the two-state-model for the folding-unfolding-process of collagen model peptides with seven Pro-Hyp-Gly-units. Nevertheless it was shown that the folded fraction did not exceeded 80%. Moreover, the aggregation of those model peptides was calculated using the relative signal intensity to a TSP-standard at different temperatures.

In this work the first covalent reversible capped collagen model peptide was synthesized. A N-terminal benzoboroxole modified collagen single strand assembled with a three times catechol modified dipeptide in aqueous solution to a capped triple helix, which is also a late stage modification. NMR-spectroscopic investigation showed the selective binding of a triple helix to one cap, excluding intertriplehelical crosslinks. This is also the first example for a quantitative esterification of boroxole in aqueous solution. The melting point was also increased with the capping of the helix, but not as strong as the increase reported for covalent irreversible capped ones.

Summary

A modification of the charge pattern of uncapped collagen model peptides showed no influence on their properties. The capping of these peptides created zwitterionic structures consisting of the formed boronate and the lysine sidechain. Capped collagen model peptides with nearby positive and negative charges formed a soluble aggregate with a well-defined melting point. With separated positive and negative charges, insoluble aggregates were formed. These aggregates were soluble at temperatures significantly above their uncapped derivatives. It was also possible to generate an insoluble aggregate through cooling from a collagen model peptide with three Pro-Hyp-Gly-units, which does not form a triple helix in the uncapped state.

Investigation of covalent irreversible capped as well as covalent reversible capped and uncapped collagen model peptides in their ability to precipitate silica led to a major observation. Only covalent irreversible capped CMPs and those, bearing a positive charge were able to precipitate silica. Furthermore, aggregation was identified as necessary parameter for precipitation. Compound with negative charges were inactive in precipitation experiments, whereas additional positive charges restored the ability. A combination of aggregation and charge pattern is fundamental for the ability of precipitating silica. Other compounds like LCPA also fit in the explanatory model.

Summary

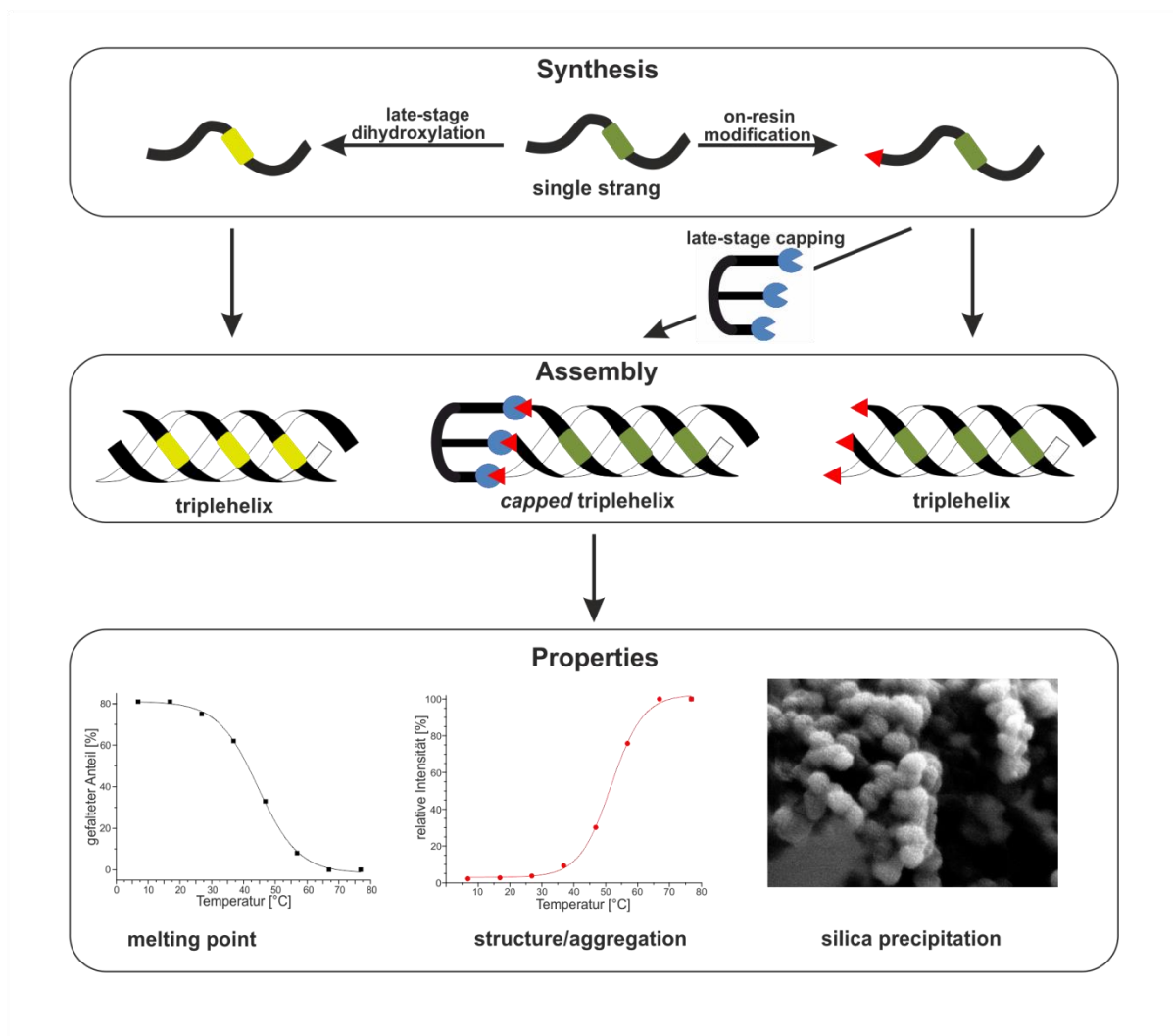
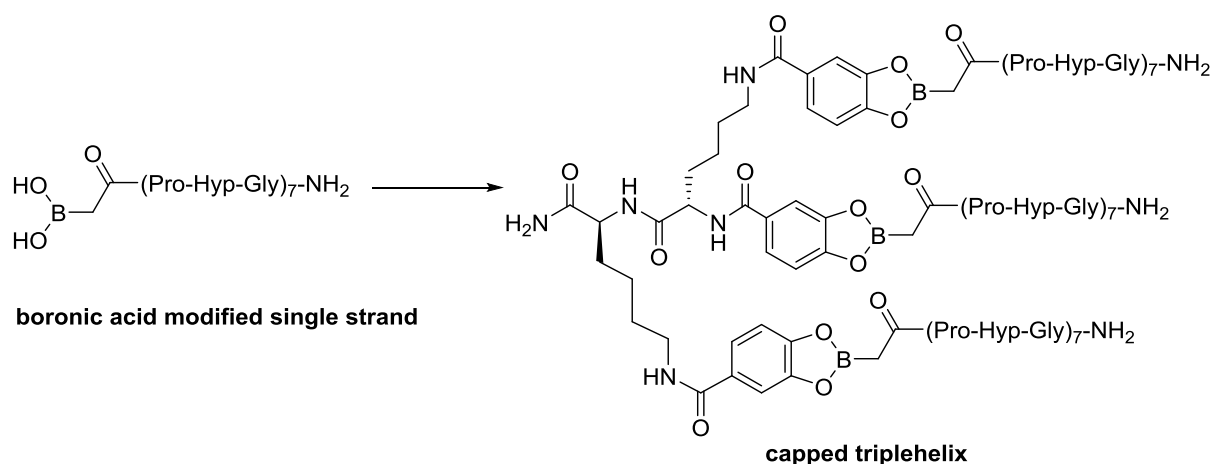


Figure 67: Synthesis of modified collagen model peptides. A triplehelical structure is formed by assembly in aqueous solution. With an cap, the capped triplehelix is formed in solution cooperatively. An analysis of structure, aggregation and melting point was performed using NMR-spectroscopical methods.

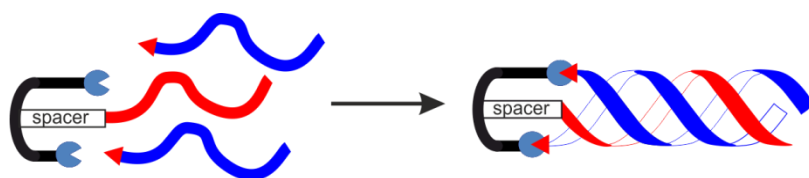
7. Outlook

Based on efficient synthesis of collagen model peptides, compound with specific aggregation are accessible and can be used in the research field of material science. In future works, the boroxole-linker can be simplified by the usage of boronic acids instead of boroxole. Boronic acid have worse diol-binding properties in aqueous solution, but the binding of three diol-functionalities of a cap could lead to complete esterification. The usage of boronic acid would also erase the negative charge of the boronate formed by the boroxole and would be less steric demanding (Scheme 27).



Scheme 27: Assembly of a capped triplehelix from a boronic acid modified single strand.

A combination of covalent reversible and irreversible linking of single strands might be possible. One single strand can be linked irreversibly to the cap and the other two in a reversible manner. This leads to well-defined heterotrimers with exact control on the register of leading, middle and lagging strand with potential usage in protein recognition (Scheme 28).^[345]



Scheme 28: Assembly of a heterotrimer. The spacer can control the register of the helix.

8. Experimenteller Teil

8.1. Allgemeine Hinweise

Lösungsmittel und Reagenzien:

Organische Lösungsmittel wurden vor Gebrauch durch Destillation gereinigt. Absolutierte Lösungsmittel wurden mittels Standardmethoden getrocknet und über Molsieb (3 Å) gelagert.^[346] Die in dieser Arbeit eingesetzten Reagenzien und Lösungsmittel wurden kommerziell bei *Sigma-Aldrich*, *Alfa-Aesar*, *TCI*, *Roth*, *Bachem*, *Merck*, *Iris-Biotech*, *Fluorochem* oder *Carbolution* erworben. Das in der Peptidsynthese verwendete DMF und Piperidin hatte die Reinheit „peptide grade“. MeCN für die RP-HPLC hatte die Reinheit „HPLC grade“. Reinstwasser für die RP-HPLC wurde mit einem *Thermo Scientific Barnstead MircoPure* Wasserreinigungssystem erhalten. Alle kommerziell erworbenen Reagenzien wurden ohne weitere Reinigung verwendet. Bei luft- bzw. wasserempfindlichen Reaktionen wurde der Reaktionskolben mehrmals mit einem Heißluftfön (600 °C) ausgeheizt und die Reaktion und Argonatmosphäre durchgeführt. Verbindung **35** wurde von *Sigma-Aldrich* erworben. LCPA **66** wurde im Arbeitskreis nach einer Literaturvorschrift dargestellt.^[347]

Dünnschichtchromatographie:

Als stationäre Phase wurden Aluminium-DC-Fertigplatten Kieselgel 60 F254 der Firma *Merck* verwendet. Die Detektion wurde durch Fluoreszenzauslöschung mit einer UV-Lampe bei einer Wellenlänge von 254 nm bzw. durch Verwendung von Anfärbereagenzien durchgeführt:

Kaliumpermanganat-Lösung:	20 g K ₂ CO ₃ , 3 g KMnO ₄ und 5 mL 10% NaOH _{aq} in 300 mL H ₂ O
Ninhydrin-Lösung	350 mg Ninhydrin und 4 mL AcOH in 100 mL <i>n</i> -BuOH

Säulenchromatographie:

Für Reinigung mittels Säulenchromatographie wurde als stationäre Phase Kieselgel 60 M (Korngröße 0,040-0,063 mm, 230-400 mesh) der Firma Merck verwendet. Elution erfolgte bei Raumtemperatur mittels N₂-Überdruck.

Kernresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie)

Alle NMR-Spektren wurden an folgenden Geräten aufgenommen:

- Bruker AV II 300 für ¹H (300.13 MHz) und ¹³C (75.4 MHz) Messungen in organischen Lösungsmitteln
- Bruker AV III HD 500 für ¹H (500.13 MHz), ¹³C (125.76 MHz) und 2D-Spektren in organischen Lösungsmitteln oder wässrigen Lösungen mit der WATERGATE-Pulssequenz zur Wasserunterdrückung
- Bruker AV III 500 für ¹H (500.13 MHz), ¹³C (125.76 MHz) und 2D-Spektren in organischen Lösungsmitteln
- Bruker AV II 600 für ¹H (600.13 MHz) und 2D-Spektren in organischen Lösungsmitteln oder wässrigen Lösungen mit der WATERGATE-Pulssequenz zur Wasserunterdrückung

Die Routinemessungen am AV II 300 erfolgte durch einen automatischen Probenwechsler. Die Messung an den Spektrometern AV III HD 500 und Bruker AV III 500 erfolgte durch Mitarbeiter der Abteilung für NMR-Spektroskopie des Fachbereichs Chemie der Philipps-Universität Marburg. Messungen am AV II 600 wurden zum größten Teil selbst durchgeführt.

Die Kalibrierung der Spektren erfolgte bei der Verwendung von deuterierten organischen Lösungsmitteln anhand des Lösungsmittelrestsignals (DMSO-*d*₆: ¹H: 2.50 ppm, ¹³C: 39.52 ppm; CDCl₃: ¹H: 7.26 ppm, ¹³C: 77.16 ppm; MeOH-*d*₃: ¹H: 3.31 ppm, ¹³C: 49.00 ppm).^[348] Bei Messungen in wässriger Lösung (10% D₂O) wurde TSP-*d*₄ als interner Standard verwendet (¹H: 0.00 ppm). Die chemische Verschiebung (δ) ist in *parts per million* (ppm) angegeben und wurde aus der Mitte des Kopplungsmusters bzw. im Falle eines Multipletts anhand der Ausdehnung des Signals bestimmt. Die Kopplungskonstanten sind in Hertz (Hz) angegeben.

Angegebene Multiplizitäten sind phänomenologisch, also ihrer Erscheinung im Spektrum und nicht ihrer theoretischen Aufspaltung entsprechend angegeben. Folgende Abkürzungen wurden dabei verwendet: s = Singulett, s_{br} = breites Singulett, d = Dublett, t = Triplett, dd = Dublett eines Dubletts, ddd = Dublett eines Doppeldubletts, dddd = Dublett eines Trippeldubletts, m = Multiplett. Aromatische Protonen, welche nicht eindeutig zugeordnet werden konnten, wurden mit dem Index „ar“ gekennzeichnet. Die Zuordnung der Signale erfolgte durch die Auswertung der 2D-Spektren (COSY, TOCSY, HSQC, HMBC und ROESY bzw. NOESY).

Massenspektrometrie:

Die Aufnahme von Massenspektren erfolgte durch Mitarbeiter der massenspektrometrischen Abteilung des Fachbereichs Chemie der Philipps-Universität Marburg an einem *Thermo Fischer Scientific Finnigan LTQ-FT* Massenspektrometer. Die angegebenen Werte sind dem HRMS-Spektren entnommen und stellen das Masse-zu-Ladungs-Verhältnis der Isotope mit der größten natürlichen Häufigkeit dar.

UV/Vis-Spektroskopie:

Die Messungen zur Bestimmung der Harzbeladung und zur Kieselsäurequantifizierung wurden an einem *Thermo Scientific Multiskan Go* in PE-Einmalküvetten (d = 1 cm) bzw. 96-well Microtiterplatten der Firma *Thermo Scientific* durchgeführt.

CD-Spektroskopie:

Die CD-Spektren wurden an einem JASCO J-810 CD-Spektrometer aufgenommen. Dabei wurde eine 110-QS Suprasil-Küvette der Firma *HELMA* (d = 0,1 cm) verwendet. Die Ansprechzeit betrug 4 s, die Bandbreite 1 nm und die Datenaufnahmerate 0,1-0,5 nm bei einer Aufnahmegeschwindigkeit von 10 nm/min. Die aufgenommenen Spektren sind dabei der Durchschnitt aus drei Messungen.

Die gemessene Elliptizität wurde in die mittlere molare Elliptizität pro Rest ($[\Theta]_{\text{MRE}}$) umgerechnet, welche den Beitrag jeder Aminosäure zum Gesamtsignal angibt (Gleichung 1).

$$\Theta_{\text{MRE}} = \Delta\varepsilon \cdot M_r \cdot (c \cdot d \cdot n)^{-1}$$

Gleichung 1: Berechnung der mittleren molaren Elliptizität pro Rest in $\text{grad} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$. $\Delta\varepsilon$: gemessene Elliptizität, M_r : Molare Masse, c : Konzentration in mg/mL , d : Schichtdicke der Küvette in cm , n : Anzahl der Aminosäuren.

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC):

Die analytische RP-HPLC-Chromatogramme wurden an einem *Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000* System bei 28 °C (Abweichende Temperaturen sind gesondert angegeben) aufgenommen. Dieses besteht aus einer *LPG-3400SD* Pumpe, einem *WPS-3000SL* Probennehmer, einem *TCC-3000SD* Säulenofen und einem *DAD-3000* Detektor. Als stationäre Phase wurde eine *ACE UltraCore 2.5 SuperC18* Säule (150 x 2,1 mm, 2,5 μm , 95 Å) verwendet. Als Eluenten wurden bei einer Flussrate von 0,45 mL/min verwendet: A: H_2O + 0,1% TFA, B: MeCN + 0,085% TFA. Die angegebenen Retentionszeiten (t_R) entsprechen den absoluten Retentionszeiten, da kein Totzeitmarker verwendet wurde.

Für semipräparative Reinigung wurde ein *Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000* semipräparatives System genutzt. Dieses besteht aus einer *HPG-3200BX* Pumpe, einem *ERC Series-300* Lösungsmittelentgaser, einem *MWD-3000* Detektor und einem *AFC-3000* Fraktionskollektor. Als stationäre Phase wurde wurden eine *Macherey-Nagel VP Nucleodur C18 Gravity* Säule (125 x 21 mm, 5 μm , 110 Å) bei einer Flussrate von 15 mL/min oder eine *ACE 5 SuperC18* Säule (150 x 10 mm, 5 μm , 90 Å) bei einer Flussrate von 7,5 mL/min verwendet. Als Eluenten wurden verwendet: A: H_2O + 0,1% TFA, B: MeCN + 0,085% TFA. Die Fraktionen wurden an einer Gefriertrocknungsanlage des Typs *Alpha 2-4 LD plus* der Firma *Christ* gefriergetrocknet.

8.2. Allgemeine Hinweise für die Peptidsynthese

Die Festphasenpeptidesynthese mittels Fmoc-Strategie mit 2-Chlortritylchlorid-Harz (2-CTC-Harz, 200-400 *mesh*, 1% DVB, Kapazität = 1,42 mmol/g) bzw. LL-Rink-Amid-Harz (100-200 *mesh*, Kapazität = 0,35 mmol/g) als polymeren Träger durchgeführt.

Beladung des 2-CTC-Harzes:

Die zur Beladung bestimmte Menge 2-CTC-Harz wurde in einer Glasfilterfritte, unter Durchmischung mittels Stickstoffstrom, bei Raumtemperatur 30 min in DMF gequellt. Nachdem das Lösungsmittel abfiltriert wurde, wurden 1,00 Äq. einer entsprechenden Fmoc-geschützten Aminosäure und 6,00 Äq. DIPEA in etwas DMF zum 2-CTC-Harz gegeben. Die Reaktionsmischung wurde mittels Stickstoffstrom 1 h durchmischt. Nach dreimaligem Waschen mit DMF, MeOH und DCM, wurde das Harz zweimal mit DCM/MeOH/DIPEA (80:15:5) für je 30 min behandelt. Dadurch sollten die restlichen Beladungsstellen des Harzes besetzt werden. Nach dreimaligem Waschen mit DMF, MeOH und DCM, wurde das Harz *in vacuo* getrocknet und die Beladung photometrisch bestimmt. Dazu wurde eine genaue Menge Harz (2-3 mg) abgewogen und mit 1,00 mL 25%iger Piperidinlösung in DMF versetzt. Nach 30 min wurde mit 5,00 mL MeOH verdünnt und die Absorption des gebildeten Piperidin-Fluoren-Addukts bei 289 nm und 301 nm bestimmt. Die Beladung wurde mittels Gleichung 2 berechnet.

$$B = E \cdot V \cdot (\epsilon \cdot d \cdot m_{\text{Harz}})^{-1}$$

Gleichung 2: Formel zur Berechnung der Beladung des 2-CTC-Harzes. B = Beladung in mmol/g, E = Extinktion, V = Gesamtvolumen in mL, ϵ = Extinktionskoeffizient in $\text{mL} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, d = Schichtdicke der Küvette in cm, m = Masse des Harzes in g.

Automatisierte Festphasenpeptidsynthese:

Die automatisierte Festphasenpeptidsynthese wurde an einem *LibertyBlue* Peptidsynthesizer der Firma CEM durchgeführt. Durch eine Mikrowellenunterstützung ermöglicht dieser die Darstellung von Peptidsequenzen mit deutlich verringertem Zeit- und Lösungsmittelaufwand. Für die Synthese wurde das folgende Protokoll verwendet:

1. Fmoc-Abspaltung: T = 50 °C (30 W), 3 min, 20% Piperidin in DMF
2. Kupplung der Aminosäuren: T = 50 °C (30 W), 10 min, DIC/Oxyma mit je 5,00 Äq.
3. Waschen: dreimal mit DMF

Manuelle Festphasenpeptidsynthese:

Die manuelle Festphasenpeptidsynthese bzw. die Abspaltung des Peptids vom Harz wurde nach folgenden Protokollen durchgeführt:

Allgemeine Vorschrift 1: Synthese von Kollagen-Modellpeptiden

1. Quellen in Toluol/DMSO (3:1) für 20 min
2. Waschen mit Toluol/DMSO (3:1), DCM und Toluol/DMSO (3:1) (je dreimal)
3. Entfernung der Fmoc-Schutzgruppe mit 30% Piperidin in DMSO + 1% Triton X-100 für 10 min bei 70 °C (je zweimal)
4. Waschen mit Toluol/DMSO (3:1), DCM und Toluol/DMSO (3:1) (je dreimal)
5. Peptidkupplungen:
 - a. (Erste Kupplung): Peptidkupplung mit 2,0 Äq. Fmoc-Baustein, 6,0 Äq. HATU und HOAt sowie 12,0 Äq. DIPEA in Toluol/DMSO (3:1) für 30 min bei 70 °C nach 10 min Voraktivierung bei Raumtemperatur
 - b. (Weitere Kupplungen mit Tripeptid-Bausteinen): Peptidkupplung mit 2,0 Äq. Fmoc-Baustein, 3,0 Äq. HATU und HOAt sowie 6,0 Äq. DIPEA in Toluol/DMSO (3:1) für 30 min bei 70 °C nach 10 min Voraktivierung bei Raumtemperatur
 - c. (Weitere Kupplungen mit Fmoc-AS-OH oder Boroxol-Derivat **36**): Peptidkupplung mit 5,0 Äq. Fmoc-Baustein, 5,0 Äq. HATU und HOAt sowie 10,0 Äq. DIPEA in Toluol/DMSO (3:1) für 30 min bei 70 °C nach 10 min Voraktivierung bei Raumtemperatur

Die Schritte 2-5 wurden solange durchgeführt, bis das gewünschte Kollagen Modell Peptid in der festen Phase aufgebaut war.

Allgemeine Vorschrift 2: Synthese von kovalent irreversiblen *capped* Kollagen Modell Peptiden

1. Quellen in Toluol/DMSO (3:1) für 20 min
2. Waschen mit Toluol/DMSO (3:1), DCM und Toluol/DMSO (3:1) (dreimal)
3. Entfernung der Fmoc-Schutzgruppe mit 30% Piperidin in DMSO + 1% Triton X-100 für 10 min bei 70 °C (zweimal)
4. Waschen mit Toluol/DMSO (3:1), DCM und Toluol/DMSO (3:1) (dreimal)
5. Kupplung der ersten zwei Aminosäuren mit 3,0 Äq. Fmoc-AS-OH, 3,0 Äq. HATU und HOAt sowie 6,0 Äq. DIPEA in Toluol/DMSO (3:1) für 30 min bei 70 °C nach 10 min Voraktivierung bei Raumtemperatur
6. Abspaltung der Dde/ivDde-Schutzgruppe mit 2% N₂H₄ in DMF für 20 min bei 70 °C (zweimal)
7. Waschen mit Toluol/DMSO (3:1), DCM und Toluol/DMSO (3:1) (dreimal)
8. Entfernung der Fmoc-Schutzgruppe mit 30% Piperidin in DMSO + 1% Triton X-100 für 10 min bei 70 °C (je zweimal)
9. Waschen mit Toluol/DMSO (3:1), DCM und Toluol/DMSO (3:1) (dreimal)
10. Peptidkupplung mit 6,0 Äq. **7**, 6,0 Äq. HATU und HOAt sowie 12,0 Äq. DIPEA in Toluol/DMSO (3:1) für 30 min bei 70 °C nach 10 min Voraktivierung bei Raumtemperatur

Die Schritte 2-5 wurden solange durchgeführt, bis das gewünschte C-terminale *cap* aufgebaut war. Nachdem in Schritt 6 die Seitenkettenschutzgruppen entfernt wurden, wurden die Schritte 7-10 solange durchgeführt, bis das gewünschte kovalent irreversibel *capped* Kollagen-Modellpeptid an der festen Phase aufgebaut war.

Allgemeine Vorschrift 3: Synthese von Catechol-modifizierten Dipeptiden

1. Quellen in Toluol/DMSO (3:1) für 20 min
2. Waschen mit Toluol/DMSO (3:1), DCM und Toluol/DMSO (3:1) (dreimal)
3. Entfernung der Fmoc-Schutzgruppe mit 30% Piperidin in DMSO + 1% Triton X-100 für 10 min bei 70 °C (zweimal)
4. Waschen mit Toluol/DMSO (3:1), DCM und Toluol/DMSO (3:1) (dreimal)
5. Kupplung der ersten zwei Aminosäuren mit 3,0 Äq. Fmoc-AS-OH, 3,0 Äq. HATU und HOAt sowie 6,0 Äq. DIPEA in Toluol/DMSO (3:1) für 30 min bei 70 °C nach 10 min Voraktivierung bei Raumtemperatur
6. Abspaltung der Dde/ivDde-Schutzgruppe mit 2% N₂H₄ in DMF für 20 min bei 70 °C (zweimal)
7. Waschen mit Toluol/DMSO (3:1), DCM und Toluol/DMSO (3:1) (dreimal)
8. Entfernung der Fmoc-Schutzgruppe mit 30% Piperidin in DMSO + 1% Triton X-100 für 10 min bei 70 °C (zweimal)
9. Kupplung von 15,0 Äq. **42**, 15,0 Äq. DIC und Oxyma in Toluol/DMSO (3:1) für 60 min bei 70 °C nach 10 min Voraktivierung bei Raumtemperatur
10. Waschen mit Toluol/DMSO (3:1), DCM und Toluol/DMSO (3:1) (dreimal)
11. Entfernen der Acetylgruppen mit 5% NaOMe in MeOH für 30 min bei Raumtemperatur (zweimal)
12. Waschen mit DCM (viermal)

Die Schritte 2-5 wurden durchgeführt, bis das entsprechende Dipeptid an der festen Phase aufgebaut war, wurden in Schritt 6 die Seitenkettenschutzgruppe entfernt. Eine Durchführung von Schritt 7-12 führte zu einer Catechol-Modifizierung an der festen Phase.

Allgemeine Vorschrift 4: Abspaltung vom Harz und Entfernung der Seitenkettenschutzgruppen

Das an der festen Phase aufgebaute Peptid wurde mit einer Abspalllösung aus TFA, TIPS und H₂O (95:4:1) vom Harz abgespalten. Dazu wurde die Suspension 30 min bei Raumtemperatur mittels eines Stickstoffstroms durchmischt. Dieser Vorgang wurde zweimal durchgeführt. Abschließend wird das Harz noch einmal mit Abspalllösung gewaschen. Das Lösungsmittel wurde auf 1-2 mL eingeeengt und in kalten Diethylether gegeben. Der entstandene Niederschlag wurde zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Der Rückstand wurde noch zwei weitere Male mit Et₂O gewaschen. Nach Trocknung des Rückstandes *in vacuo* wurde dieser in H₂O (H₂O/MeCN 4:1 bei schlechter Löslichkeit) gelöst und an einer Anlage zur Gefriertrocknung (*Alpha 2-4 LD plus* der Firma *Christ*) getrocknet.

Allgemeine Vorschrift 5: Abspaltung vom Harz ohne Entfernung von säurelabilen Seitenkettenschutzgruppen

Das an der festen Phase aufgebaute Peptid wurde mit einer Abspalllösung aus 1% TFA in DCM vom Harz abgespalten. Dazu wurde die Suspension 20 min bei Raumtemperatur mittels Stickstoffstrom durchmischt. Dieser Vorgang wurde viermal wiederholt, wobei das Filtrat jedes Schrittes in Toluol (20 mL) gegeben wurde. Es wurde viermal mit Toluol koevaporiert, um TFA zu entfernen. Dann wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in H₂O/MeCN (4:1) gelöst und gefriergetrocknet.

Allgemeine Vorschrift 6: Zyklisierung von Peptiden in Lösung

Eine Lösung von HATU und HOAt (je 2,5-5,0 Äq.) und DIPEA (7,5-15 Äq.) in DMF (etwa 1 mL pro 2,5 mg Peptid) wurde auf 0 °C gekühlt. Das zu zyklisierende Peptid in DMF (1 mL pro 15 mg Peptid) wurde innerhalb einer Stunde zugetropft. Nach Abschluss der Reaktion wurde das Lösungsmittel abkondensiert und der Rückstand *in vacuo* getrocknet.

8.3. Allgemeine Arbeitsvorschriften

8.3.1. Kieselsäurefällung und –quantifizierung

Kieselsäure:

Eine frisch hergestellte Lösung aus 1 M TMOS in 1 mM HCl wurde 45 min inkubiert und als Kieselsäurequelle verwendet.

Kieselsäurefällung:^[170]

Die entsprechenden Peptide (bzw. das Polyamin) wurden in 30 mM Kaliumphosphatpuffer (pH = 7,2) gelöst. Die Konzentration der Stammlösungen betrug 1 mM. Mit 30 mM Kaliumphosphatpuffer (pH = 7,2) wurde auf 250 µL der zu untersuchende Konzentration verdünnt und 30 min inkubiert. Die Kieselsäurefällung wurde durch die Zugabe von 1 M Kieselsäure (25 µL) gestartet. Nach exakt 10 min bei Raumtemperatur wurde die Fällungsreaktion mit 1 M HCl (25 µL) gestoppt. Das Präzipitat wurde zentrifugiert (13000 rpm) und der Rückstand dreimal mit H₂O (400 µL) gewaschen.

Quantifizierung mittels modifiziertem *β-silicomolybdate assay*:^[87, 333]

Der Rückstand wurde in 2 M NaOH (500 µL) gelöst 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. 1,35 mL HCl (37%) wurde in H₂O (40,3 mL) gelöst und 774 mg [(NH₄)₆Mo₇O₂₄•4H₂O] wurden in H₂O (9,70 mL) gelöst. Beide Lösungen wurden vereinigt und mit 2 M NaOH auf pH = 1,12 gebracht (Molybdatlösung). Zu einer Probe mit gelöster Kieselsäure (10, 20 oder 40 µL), einem entsprechenden Volumen 2 M NaOH (30, 20 oder 0 µL) und H₂O (160 µL) wurde Molybdatlösung (800 µL) gegeben. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 370 nm gemessen. Durch eine Kalibrierreihe aus einer Siliziumstandartlösung wurde der Gehalt an Kieselsäure bestimmt.

8.3.2. Schmelzpunktbestimmung mittels NMR-Spektroskopie

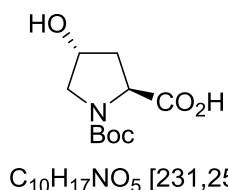
Zur Bestimmung des Schmelzpunktes der Kollagen Modell Peptide wurden ¹H-NMR-Spektren von 280 K bis 350 K in 10 K Schritten aufgenommen. Vor jeder Messung wurde 15 min bei der jeweiligen Temperatur äquilibriert. Zur Bestimmung des Anteils der Protonen in tripelhelikaler Umgebung, welche dem Anteil an tripelhelikaler Spezies entsprechen, wurde das Integralverhältnis zwischen dem Signal der aliphatischen Protonen zwischen 1.20 ppm und 2.60 ppm und dem Signal der H_δ-Protonen der Proline bei 3.20 ppm ermittelt. Der Quotient aus ermitteltem Wert und

dem Maximalwert (ein Protonen in tripelhelikaler Umgebung pro PUG-Repetiereinheit) ergibt den Anteil tripelhelikal assemblierter Spezies. Trägt man die so ermittelten Werte gegen die Temperatur auf, so stellt der Wendepunkt der sigmoidalen Kurve den Schmelzpunkt dar.

8.3.3. Bestimmung des Aggregationsgrades

Die Bestimmung des Aggregationsgrades erfolgte durch die Relative Intensität des TSP-Signals bei 0 ppm im Vergleich zu den Signalen der aliphatischen Protonen zwischen 1.20 ppm und 2.60 ppm. Als Wert für keine bzw. minimale Aggregation wurde dabei der Wert bei 350 K definiert. Der Aggregationsgrad wurde daraufhin relativ zu diesem Wert bei 350 K berechnet.

8.4. Darstellung der Verbindungen

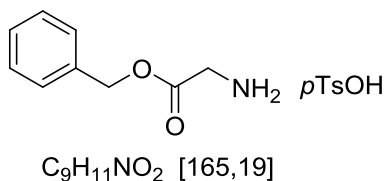
Boc-Hyp-OH (1)^[349]

13,1 g **H-Hyp-OH** (100 mmol, 1,00 Äq.) wurden in THF/H₂O (2:1, 200 mL) gelöst und mit 10%iger NaOH_{aq} (40 mL) und 32,7 g Boc₂O (150 mmol, 1,50 Äq.) versetzt. Die Reaktionslösung wurde 16 h bei RT gerührt. Das THF wurde unter vermindertem Druck entfernt und die wässrige Phase mit 10%iger KHSO_{4aq} auf pH = 2 gebracht. Die wässrige Phase wurde mit EtOAc (3 x 200 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit H₂O (200 mL) und ges. NaCl_{aq} gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. **Boc-Hyp-OH (1)**, 19,8 g, 86%) wurde als farbloser Schaum erhalten.

DC: $R_f = 0,33$ (DCM/MeOH 9:1 + 1% AcOH)

¹H-NMR: 300 MHz, 300 K, DMSO-*d*₆ (*trans/cis* 66:34, Hauptisomer angegeben): δ [ppm] = 1.34 (s, 9H, CMe₃), 1.80-1.95 (m, 1H, H_β), 2.02-2.18 (m, 1H, H_β), 3.20-3.29 (m, 1H, H_δ), 3.35 (dd, ²*J* = 10.6, ³*J* = 4.5 Hz, 1H, H_δ), 4.07-4.15 (m, 1H, H_γ), 4.19-4.27 (m, 1H, H_α), 5.04 (s_{br}, 1H, OH), 12.38 (s_{br}, 1H, COOH).

HRMS (ESI(+)): ber. für C₁₀H₁₇NO₅Na [M+Na]⁺: 254.0999; gef.: 254.0999.

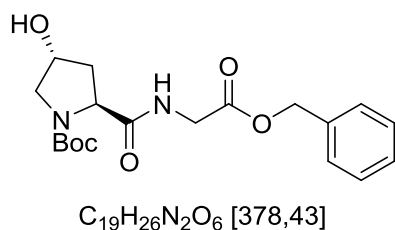
H-Gly-OBn·pTsOH (2)^[196]

18,8 g **H-Gly-OH** (250 mmol, 1,00 Äq.) und 47,6 g pTsOH·H₂O (250 mmol, 1,00 Äq.) wurden in BnOH/Toluol (1:1, 400 mL) suspendiert. Nun wurde mit Wasserabscheider 19 h unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen auf RT wurde Et₂O zugegeben und es bildete sich ein farbloser Niederschlag. Der Niederschlag wurde abfiltriert, mit EtOAc gewaschen und getrocknet. **H-Gly-OBn·pTsOH (2)**, 66,0 g, 83%) wurde als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR: 300 MHz, 300 K, DMSO-*d*₆: δ [ppm] = 2.29 (s, 3H, Ts-CH₃), 3.90 (s, 2H, H_α), 5.23 (s, 2H, CH₂Ph), 7.12 (d, ³*J* = 7.9 Hz, 2H, Ts-CH-3,5), 7.30-7.45 (m, 5H, H_{ar}), 7.50 (d, d, ³*J* = 7.9 Hz, 2H, Ts CH-2,4), 8.26 (s_{br}, 3H, NH₃⁺).

HRMS (ESI(+)): ber. für $C_9H_{11}NO_1H$ $[M+H]^+$: 166.0863; gef.: 166.0862.

Boc-Hyp-Gly-OBn (3)



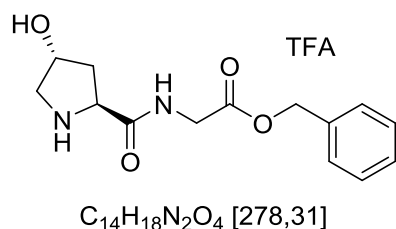
11,6 g **Boc-Hyp-OH** (**1**, 50,2 mmol, 1,00 Äq.) und 16,9 g **H-Gly-OBn·pTsOH** (**2**, 50,2 mmol, 1,00 Äq.) wurden in DMF (100 mL) gelöst. Dann wurden 22,9 g HATU (60,2 mmol, 1,20 Äq.), 15,2 g HOAt (60,2 mmol, 1,20 Äq.) und 34,1 mL DIPEA (201 mmol, 4,00 Äq.)

zugegeben und 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde abkondensiert und der Rückstand in $CHCl_3$ (500 mL) aufgenommen. Die organische Phase wurde mit ges. $NaHCO_{3aq}$ (500 mL), 2M HCl (500 mL), ges. $NaHCO_{3aq}$ (500 mL) und ges. $NaCl_{aq}$ (500 mL) gewaschen, über $MgSO_4$ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde über Kieselgel säulenchromatographisch gereinigt (EtOAc). **Boc-Hyp-Gly-OBn** (**3**, 15,9 g, 84%) wurde als farbloser Schaum erhalten.

DC: $R_f = 0,31$ (EtOAc)

1H -NMR: 300 MHz, 300 K, $DMSO-d_6$ (*trans/cis* 66:34, Hauptisomer angegeben): δ [ppm] = 1.32 (s, 9H, CM_3), 1.74-1.89 (m, 1H, Hyp- H_β), 1.93-2.08 (m, 1H, Hyp- H_β), 3.18-3.31 (m, 1H, Hyp- H_δ), 3.34-3.44 (m, 1H, H_δ), 3.84 (dd, $^2J = 17.4$, $^3J = 5.9$ Hz, 1H, Gly- H_α), 3.93 (dd, $^2J = 17.4$, $^3J = 5.9$ Hz, 1H, Gly- H_α), 4.11-4.26 (m, 2H, Hyp- H_α , Hyp- H_γ), 4.99 (d, $^3J = 3.3$ Hz, 1H, OH), 5.08-5.14 (m, 2H, CH_2Ph), 7.28-7.40 (m, 5H, H_{ar}), 8.37 (t, $^3J = 5.9$ Hz, 1H, Gly-NH).

HRMS (ESI(+)): ber. für $C_{19}H_{16}N_2O_6Na$ $[M+Na]^+$: 401.1683; gef.: 401.1688.

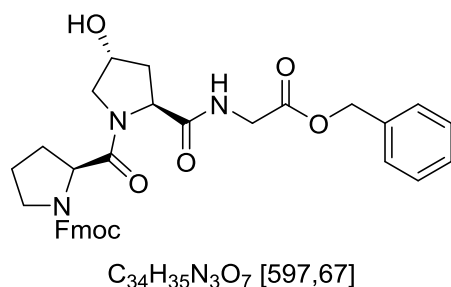
H-Hyp-Gly-OBn•TFA (4)

24,0 g **Boc-Hyp-Gly-OBn (3)**, 63,4 mmol) wurden in MeOH (40 mL) gelöst und mit TFA (160 mL) versetzt. Dann wurde 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und **H-Hyp-Gly-OBn•TFA (4)** in quantitativer

Ausbeute als rötliches Öl erhalten.

$^1\text{H-NMR}$: 300 MHz, 300 K, DMSO- d_6 : δ [ppm] = 1.80-1.95 (m, 1H, Hyp- H_β), 2.21-2.35 (m, 1H, Hyp- H_β), 3.02-3.14 (m, 1H, Hyp- H_δ), 3.23-3.38 (m, 1H, Hyp- H_δ), 4.00 (dd, $^2J = 17.4$, $^3J = 5.9$ Hz, 1H, Gly- H_α), 4.07 (dd, $^2J = 17.4$, $^3J = 5.9$ Hz, 1H, Gly- H_α), 4.27-4.47 (m, 2H, Hyp- H_α , Hyp- H_γ), 5.15 (s, 2H, CH_2Ph), 7.27-7.51 (m, 5H, H_{ar}), 8.73 (s_{br}, 1H, NH_2^+), 9.03 (t, $^3J = 5.9$ Hz, 1H, Gly-NH), 9.63 (s_{br}, 1H, NH_2^+).

HRMS (ESI(+)): ber. für $C_{14}H_{18}N_2O_4H$ $[M+H]^+$: 279.1339; gef.: 279.1338.

Fmoc-Pro-Hyp-Gly-OBn (5)

24,9 g **H-Hyp-Gly-OBn•TFA (4)**, 63,4 mmol, 1,00 Äq.) und Fmoc-Pro-OH wurden in DMF (100 mL) gelöst. 28,8 g HBTU (76,1 mmol, 1,20 Äq.), 11,7 g HOBt• H_2O (76,1 mmol, 1,20 Äq.) und 43,2 mL DIPEA (250 mmol, 4,00 Äq.) wurden zugegeben und 20 h bei

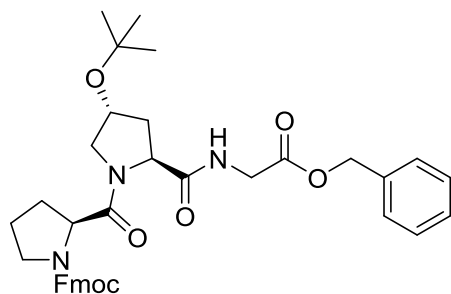
Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde abkondensiert und der Rückstand in CHCl_3 gelöst. Die organische Phase wurde mit 0.5 M $\text{NaHCO}_{3\text{aq}}$ (500 mL), 2 M HCl_{aq} (500 mL), 0.5 M $\text{NaHCO}_{3\text{aq}}$ (500 mL) und ges. NaCl_{aq} (500 mL) gewaschen, über MgSO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde über Kieselgel säulenchromatographisch gereinigt (EtOAc \rightarrow EtOAc/MeOH 9:1). **Fmoc-Pro-Hyp-Gly-OBn (5)**, 13,0 g, 54%) wurde als farbloser Schaum erhalten.

DC: $R_f = 0,40$ (EtOAc/MeOH 9:1)

¹H-NMR: 300 MHz, 300 K, DMSO-*d*₆ (Hauptisomer angegeben): δ [ppm] = 1.66-2.30 (m, 6H, Pro-H_β, Pro-H_γ, Hyp-H_β), 3.34-3.54 (m, 3H, Pro-H_δ, Hyp-H_δ), 3.54-3.70 (m, 1H, Hyp-H_δ), 3.74-3.97 (m, 2H, Gly-H_α), 4.10-4.60 (m, 6H, Pro-H_α, Hyp-H_α, Hyp-H_γ, Fmoc-CH₂, Fmoc-H₉), 5.00-5.20 (m, 3H, CH₂Ph, OH), 7.17-7.49 (m, 9H, Ph-H_{ar}, Fmoc-H_{ar}), 7.50-7.70 (m, 2H, Fmoc-H_{ar}), 7.79-7.94 (m, 2H, Fmoc-H_{ar}), 8.29 (t, ³*J* = 5.9 Hz, 1H, Gly-NH).

HRMS (ESI(+)): ber. für C₃₄H₃₅N₃O₇H [M+H]⁺: 598.2548; gef.: 598.2547.

Fmoc-Pro-Hyp(*t*Bu)-Gly-OBn (6)



C₃₈H₄₃N₃O₇ [653,78]

Vorschrift 1:

2,78 g **Fmoc-Pro-Hyp-Gly-OBn (5)**, 4,65 mmol, 1,00 Äq.) wurde in Isobuten (8% in DCM, 200 mL) gelöst. 198 µL konz. H₂SO₄ (3,72 mmol, 0,80 Äq.) wurden zugegeben und die Reaktionslösung 7

Tage bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurde 1 M NaHCO_{3aq} (100 mL) zugegeben und 1 h bei Raumtemperatur gerührt. H₂O (100 mL) wurde zugegeben und die Phasen getrennt. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde über Kieselgel säulenchromatographisch gereinigt (Toluol/EtOAc 4:1 → 1:4). **Fmoc-Pro-Hyp(*t*Bu)-Gly-OBn (6)**, 2,16 g, 71%) wurde als farbloser Schaum erhalten.

Vorschrift 2:

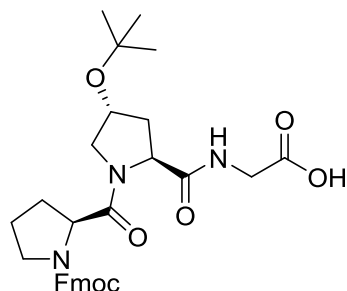
18,3 g Boc₂O (1,67 mmol, 50 Äq.) wurden unter Argonatmosphäre auf 40 °C erhitzt und 1,00 g **Fmoc-Pro-Hyp-Gly-OBn (5)**, 1,67 mmol, 1,00 Äq.) zugegeben. Dann wurde solange DCM_{abs.} zugegeben bis **5** vollständig gelöst war. Dann wurden 131 mg Mg(ClO₄)₂ (0,59 mmol, 0,35 Äq.) zugegeben und 16 h bei 40 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt über Kieselgel säulenchromatographisch gereinigt (EtOAc). **Fmoc-Pro-Hyp(*t*Bu)-Gly-OBn (6)**, 1,10 g, quant.) wurde als farbloser Schaum erhalten.

DC: $R_f = 0,37$ (Toluol/EtOAc 1:4)

$^1\text{H-NMR}$: 300 MHz, 300 K, DMSO- d_6 (Hauptisomer angegeben): δ [ppm] = 1.03 (s, 9H, CMe₃), 1.71-2.25 (m, 6H, Pro-H _{β} , Pro-H _{γ} , Hyp-H _{β}), 3.19-3.45 (m, 3H, Pro-H _{δ} , Hyp-H _{δ}), 3.63-3.77 (m, 1H, Hyp-H _{δ}), 3.78-4.04 (m, 2H, Gly-H _{α}), 4.11-4.51 (m, 6H, Pro-H _{α} , Hyp-H _{α} , Hyp-H _{γ} , Fmoc-CH₂, Fmoc-H₉), 5.12 (s, 2H, CH₂Ph), 7.10-7.47 (m, 9H, Ph-H_{ar}, Fmoc-H_{ar}), 7.52-7.70 (m, 2H, Fmoc-H_{ar}), 7.83-7.95 (m, 2H, Fmoc-H_{ar}), 8.32 (t, $^3J = 5.9$ Hz, 1H, Gly-NH).

HRMS (ESI(+)): ber. für C₃₈H₄₃N₃O₇H [M+H]⁺: 654.3174; gef.: 654.3180.

Fmoc-Pro-Hyp(*t*Bu)-Gly-OH (7)



C₃₁H₃₇N₃O₇ [563,65]

1,64 g **Fmoc-Pro-Hyp(*t*Bu)-Gly-OBn (6)**, 2,51 mmol, 1,00 Äq.) wurde in EtOAc (60 mL) gelöst und mit 164 mg Pd/C (5%) versetzt. Unter H₂-Atmosphäre (10 bar) wurde 66 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt über Kieselgel säulenchromatographisch gereinigt (EtOAc → EtOAc/MeOH 4:1). **Fmoc-Pro-**

Hyp(*t*Bu)-Gly-OH (7), 1,22 g, 86%, 94% *brsm*) wurde als farbloser Schaum erhalten.

DC: $R_f = 0,14$ (EtOAc/MeOH 4:1)

$^1\text{H-NMR}$: 300 MHz, 300 K, DMSO- d_6 (Hauptisomer angegeben): δ [ppm] = 1.06 (s, 9H, CMe₃), 1.74-2.33 (m, 6H, Pro-H _{β} , Pro-H _{γ} , Hyp-H _{β}), 3.15-3.55 (m, 3H, Pro-H _{δ} , Hyp-H _{δ}), 3.59-3.88 (m, 3H, Gly-H _{α} , Hyp-H _{δ}), 4.13-4.59 (m, 6H, Pro-H _{α} , Hyp-H _{α} , Hyp-H _{γ} , Fmoc-CH₂, Fmoc-H₉), 7.24-7.50 (m, 4H, Fmoc-H_{ar}), 7.53-7.73 (m, 2H, Fmoc-H_{ar}), 7.84-7.97 (m, 2H, Fmoc-H_{ar}), 8.01-8.12 (m, 1H, Gly-NH), 12.63 (s_{br}, 1H, COOH).

HRMS (ESI(+)): ber. für C₃₁H₃₇N₃O₇Na [M+Na]⁺: 586.2524; gef.: 586.2524.

Ac-(Pro-Hyp-Gly)₇-NH₂ (8)

Ac-(Pro-Hyp-Gly)₇-NH₂ (8) wurde nach der *allgemeinen Vorschrift 1* in einer Ansatzgröße von 0,05 mm auf Rink-Amid-Harz (B = 0,35 mmol/g, 100-200 mesh) synthetisiert. Nach einer N-terminalen Acetylierung mit 30,0 Äq. DIPEA und 30,0 Äq. Ac₂O erfolgte die Abspaltung vom Harz nach der *allgemeinen Vorschrift 4*. Nach Reinigung mittels semipräparativer RP-HPLC (2 → 20 B in 60 min bei 50 °C) wurde **Ac-(Pro-Hyp-Gly)₇-NH₂ (8**, 24,6 mg, 25%) als farbloser Feststoff erhalten.

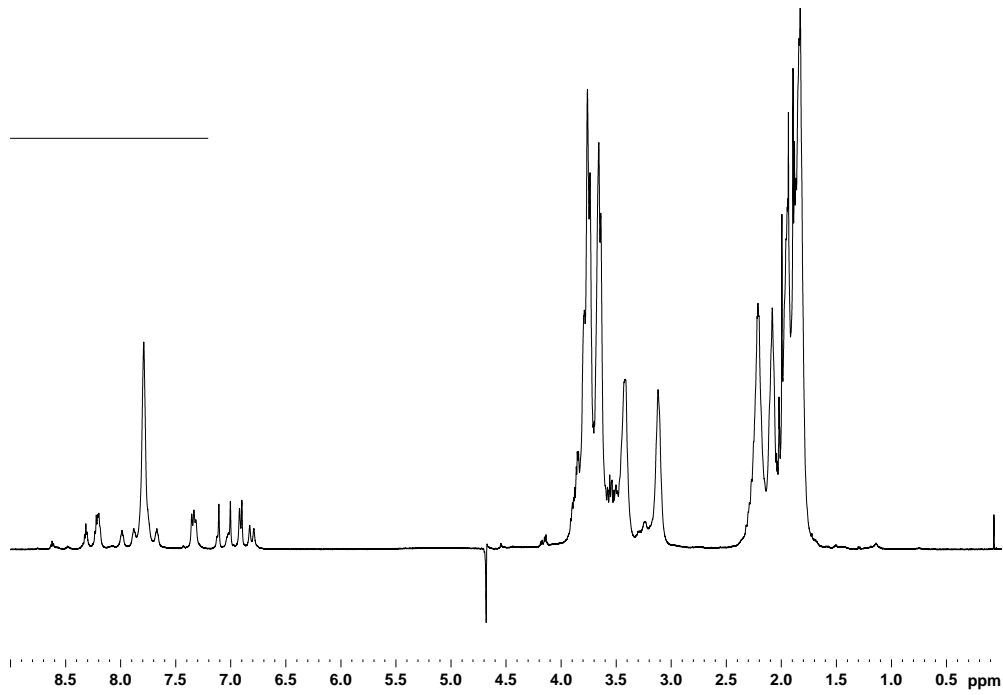
¹H-NMR: 600 MHz, 300 K, H₂O/D₂O 9:1 (Tripelhelix, [Ac-(PUG)₇-NH₂]₃): δ [ppm] = 1.77-2.02 (m, 93H, Pro-H_γ, Pro-H_β, Hyp-H_β, Ac), 2.07-2.28 (m, 42H, Pro-H_β, Hyp-H_β), 3.00-3.30 (m, 21H, Pro-H_δ), 3.38-3.50 (m, 21H, Pro-H_δ), 3.63-3.72 (m, 42H, Gly-H_α, Hyp-H_δ), 3.73-3.85 (m, 42H, Gly-H_α, Hyp-H_δ), 4.51-4.60 (m, 21H, Hyp-H_γ), 4.69-4.72 (m, 42H, Pro-H_α, Hyp-H_α), 6.81 (s, 1H, NH₂), 6.85 (s, 1H, NH₂), 6.95 (s, 1H, NH₂), 7.28-7.40 (m, 3H, NH₂), 7.63-8.26 (m, 21H, Gly-NH).

¹H-NMR: 500 MHz, 350 K, H₂O/D₂O 9:1 (Einzelstrang, Ac-(PUG)₇-NH₂): δ [ppm] = 1.66-2.00 (m, 21H, Pro-H_β, Pro-H_γ), 2.02-2.10 (m, 10H, Hyp-H_β, Ac), 2.15-2.44 (m, 14H, Hyp-H_β, Pro-H_β), 3.36-3.68 (m, 14H, Pro-H_δ), 3.75-3.93 (m, 21H, Gly-H_α, Hyp-H_δ), 4.14-4.22 (m, 7H, Gly-H_α), 4.51-4.86 (m, 21H, Hyp-H_α, Hyp-H_γ, Pro-H_α), 7.76-8.40 (m, 7H, Gly-NH).

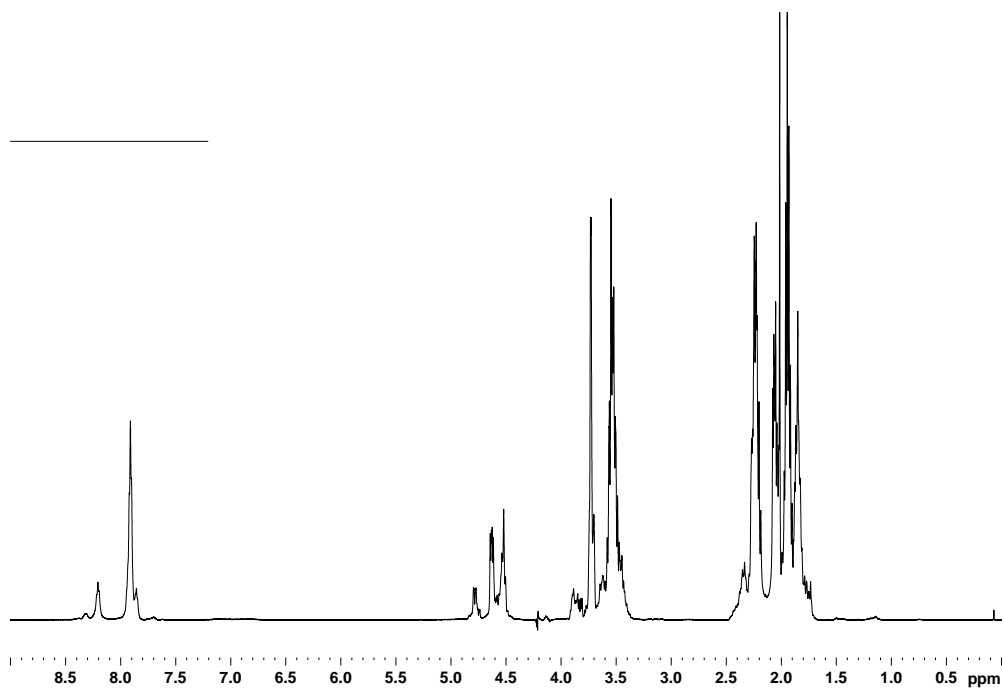
HRMS (ESI(+)): ber. für C₈₆H₁₂₄N₂₂O₂₉Na₂ [M+2Na]²⁺: 987.9357; gef.: 987.9366.

HPLC: *t_R* = 13,8 min (Gradient: 2 → 20% B in 20 min bei 60 °C).

Experimenteller Teil

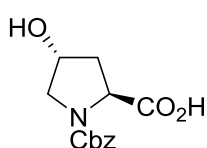


^1H -NMR: 500 MHz, 300 K, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1 (Tripelhelix)



^1H -NMR: 500 MHz, 350 K, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1 (Einzelstrang)

Cbz-Hyp-OH^[222, 350]

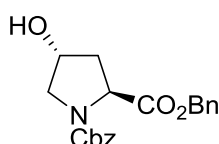


6,56 g **H-Hyp-OH** (50,0 mmol, 1,00 Äq.) wurden in THF/1 M NaOH_{aq} (1:1, 100 mL) gelöst. Bei 0 °C wurde 8,92 mL CbzCl (62,5 mmol, 1,25 Äq.) in THF (50 mL) und 1 M NaOH_{aq} (60 mL) C₁₃H₁₅NO₅ [265,27] über einen Zeitraum von 1,5 Stunden zugetropft. Nach 18 Stunden bei Raumtemperatur wurde mit H₂O (50 mL) verdünnt und mit EtOAc (3 x 125 mL) gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit 2 M HCl_{aq} auf pH = 3 gebracht und mit EtOAc (4 x 125 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. **Cbz-Hyp-OH** (12,2 g, 92%) wurde als farbloser Schaum erhalten.

DC: R_f = 0,37 (DCM/MeOH 10:1 + 1% AcOH)

¹H-NMR: 300 MHz, 300 K, DMSO-*d*₆ (Hauptisomer angegeben): δ [ppm] = 1.86-2.02 (m, 1H, H_β), 2.08-2.25 (m, 1H, H_β), 3.33-3.52 (m, 2H, H_δ), 4.16-4.33 (m, 2H, H_α, H_γ), 4.99-5.13 (m, 3H, OH, PhCH₂), 7.24-7.40 (m, 5H, H_{ar}).

Cbz-Hyp-OBn (9)^[190, 222]

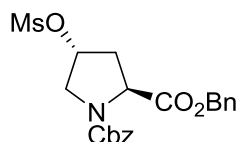


12,2 g **Cbz-Hyp-OH** (46,0 mmol, 1,00 Äq.) wurden in DMF (90 mL) gelöst und mit 12,7 g K₂CO₃ (92,0 mmol, 2,00 Äq.), 689 mg NaI (4,60 mmol, 0,10 Äq.) und 16,4 mL BnBr C₂₀H₂₁NO₅ [355,39] (138 mmol, 3,00 Äq.) versetzt und für 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurde H₂O (250 mL) zugegeben und die wässrige Phase mit EtOAc (3 x 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit H₂O (2 x 100 mL) und ges. NaCl_{aq} (100 mL) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde über Kieselgel säulenchromatographisch gereinigt (DCM → DCM/MeOH 20:1). **Cbz-Hyp-OBn (9)** (12,8 g, 78%) wurde als gelbliches, hoch viskoses Öl erhalten.

DC: R_f = 0,37 (DCM/MeOH 10:1 + 1% AcOH)

¹H-NMR: 300 MHz, 300 K, DMSO-*d*₆ (Hauptisomer angegeben): δ [ppm] = 1.88-2.04 (m, 1H, H_β), 2.11-2.26 (m, 1H, H_β), 3.35-3.54 (m, 2H, H_δ), 4.24-4.33 (m, 1H, H_γ), 4.41 (t, ³*J* = 8,2 Hz, 1H, H_α) 4.96-5.20 (m, 5H, OH, PhCH₂), 7.16-7.45 (m, 10H, H_{Ar}).

Cbz-Hyp(Ms)-OBn (10)^[222]

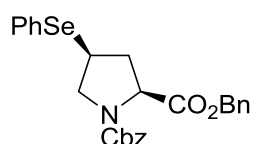


12,4 g **Cbz-Hyp-OBn (1)**, 35,0 mmol, 1,00 Äq.) wurde in DCM (130 mL) gelöst und auf 0 °C gekühlt. 1,28 g DMAP (10,5 mmol, 0,30 Äq.), 6,70 mL NEt₃ (48,8 mmol, 1,40 Äq.) und C₂₁H₂₃NO₇S [433,48] 3,78 mL MsCl (48,8 mmol, 1,40 Äq.) wurden zugegeben. Nach 2 h bei Raumtemperatur wurde H₂O (25 mL) zugegeben und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde mit DCM (3 x 30 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl_{aq} gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. **Cbz-Hyp(Ms)-OBn (10)**, 15,5 g, 90%) wurde als gelbliches, hochviskoses Öl erhalten. Aus diesem hochviskosen Öl kristallisierten nach einer Zeit messbare Einkristalle aus.

DC: *R_f* = 0,43 (Pentan/EtOAc 2:3).

¹H-NMR: 300 MHz, 300 K, DMSO-*d*₆ (Hauptisomer angegeben): δ [ppm] = 2.20-2.38 (m, 1H, H_β), 2.55-2.69 (m, 1H, H_β), 3.25 (s, 3H, CH₃), 3.64-3.72 (m, 1H, H_δ), 3.73-3.82 (m, 1H, H_δ), 4.50 (t, ³*J* = 8.1 Hz, 1H, H_α), 5.00-5.20 (m, 4H, PhCH₂), 5.30 (bs, 1H, H_γ), 7.22- 7.42 (m, 10H, H_{Ar}).

Dibenzyl (2*S*,4*S*)-4-(phenylselanyl)pyrrolidin-1,2-dicarboxylat (11)^[5, 222, 351]



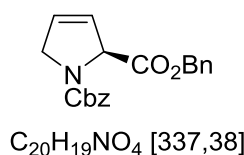
6,55 g Ph₂Se₂ (21,0 mmol, 0,60 Äq.) wurden in *tert*-BuOH (100 mL) gelöst und bei 80 °C mit 1,63 g NaBH₄ (43,0 mmol, 1,20 Äq.) versetzt. Dann wurde solange unter Rückfluss erhitzt, bis sich die Lösung entfärbte. 15,2 g **Cbz-Hyp(Ms)-OBn (10)**, 35,0 mmol, 1,00 Äq.) wurde in *tert*-BuOH (120 mL) zugegeben und 3 h unter Rückfluss erhitzt. EtOAc (400 mL) wurde zugegeben und die organische Phase mit H₂O (3 x 500 mL) und ges. NaCl_{aq} (200 mL) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und der Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde über Kieselgel säulenchromatographisch gereinigt (DCM →

DCM/MeOH 100:1). **Dibenzyl (2S,4S)-4-(phenylselanyl)pyrrolidin-1,2-dicarboxylat (11, 13,7 g, 79%)** wurde als gelbliches, hochviskoses Öl erhalten.

DC: $R_f = 0,45$ (Pentan/EtOAc 4:1).

$^1\text{H-NMR}$: 300 MHz, 300 K, DMSO- d_6 (Hauptisomer angegeben): δ [ppm] = 1.95-2.03 (m, 1H, H_β), 2.68-2.85 (m, 1H, H_β), 3.23-3.40 (m, 1H, H_δ), 3.79 -4.04 (m, 2H, H_γ , H_δ), 4.37-4.53 (m, 1H, H_α), 4.87-5.21 (m, 4H, PhCH_2O), 7.13-7.56 (m, 15H, H_{ar}).

Cbz-Dhp-OBn (12)^[5, 222, 351]

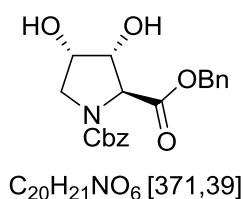


13,7 g **Dibenzyl (2S,4S)-4-(phenylselanyl)pyrrolidin-1,2-dicarboxylat (11, 27,7 mmol, 1,00 Äq.)** wurden in DCM (210 mL) gelöst. 3,13 mL Pyridin (38,8 mmol, 1,40 Äq.) wurden zugegeben und die Lösung auf 0 °C gekühlt. 3,93 mL H_2O_2 (50 gew% in H_2O , 69,3 mmol, 2,40 Äq.) wurden zugegeben und 5 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in EtOAc (100 mL) gelöst und mit 0,1 M HCl_{aq} (50 mL), ges. $\text{NaHCO}_{3\text{aq}}$ (50 mL) und ges. NaCl_{aq} gewaschen, über MgSO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde über Kieselgel säulenchromatographisch gereinigt (DCM \rightarrow DCM/MeOH 100:1 \rightarrow 50:1). **Cbz-Dhp-OBn (12, 7,70 g, 82%)** wurde als farbloses, viskoses Öl erhalten.

DC: $R_f = 0,34$ (DCM/MeOH 100:1).

$^1\text{H-NMR}$: 300 MHz, 300 K, DMSO- d_6 (Hauptisomer angegeben): δ [ppm] = 4.10-4.30 (m, 2H, H_δ), 4.93-5.24 (m, 5H, H_α , PhCH_2), 5.81- 5.91 (m, 1H, H_γ), 6.06-6.17 (m, 1H, H_β), 7.10-7.50 (m, 10 H, H_{ar}).

Cbz-Dyp-OBn (13)^[5, 222]



Vorschrift 1:

2,00 g **Cbz-Dhp-OBn (12)**, 5,93 mmol, 1,00 Äq.) wurden in *tert*-BuOH/H₂O (7:3, 100 mL) gelöst. 800 mg NMO•H₂O (5,93 mmol, 1,00 Äq.) und 44,0 mg K₂OsO₄•2H₂O (120 µmol, 2 mol%) wurden zugegeben und die Reaktionslösung 21 h bei Raumtemperatur gerührt. 5%ige Na₂SO_{3aq} (50 mL) wurden zugegeben und weiter 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Die wässrige Phase wurde mit EtOAc (3 x 100 mL) extrahiert. The vereinigten organischen Phasen wurden mit 0,1 M HCl_{aq} (100 mL) und ges. NaCl_{aq} (100 mL) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt (d.r. 10:1) wurde über Kieselgel säulenchromatographisch gereinigt (DCM/MeOH 20:1). **Cbz-Dyp-OBn (13)**, 1,56 g, 71%)

Vorschrift 2:

4,60 g **Cbz-Dhp-OBn (12)**, 13,6 mmol, 1,00 Äq.) wurden in Aceton/H₂O (6:1, 140 mL) gelöst. 2,00 g NMO (17,0 mmol, 1,25 Äq.), 2,15 g Citronensäure•H₂O (10,2 mmol, 0,75 Äq.) und 151 mg K₂OsO₄•2H₂O (409 µmol, 3 mol%) wurden zugegeben und die Reaktionslösung 1,5 h bei Raumtemperatur gerührt. Ges. Na₂SO_{3aq} (40 mL) wurden zugegeben und weiter 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in H₂O (150 mL) gelöst. Die wässrige Phase wurde mit EtOAc (3 x 150 mL) extrahiert. The vereinigten organischen Phasen wurden mit 0,1 M HCl_{aq} (100 mL) und ges. NaCl_{aq} (100 mL) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt (d.r. 13:1) wurde über Kieselgel säulenchromatographisch gereinigt (DCM/MeOH 20:1). **Cbz-Dyp-OBn (13)**, 3,80 g, 75%)

Vorschrift 3:

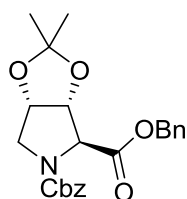
500 mg **Cbz-Dhp-OBn (12)**, 1,48 mmol, 1,00 Äq.) wurden in *tert*-BuOH/H₂O (7:3, 25 mL) gelöst. 200 mg NMO•H₂O (1,48 mmol, 1,00 Äq.), 86,0 mg (DHDQ)₂Phal (111 mmol, 7,50 mol%) und 16,0 mg K₂OsO₄•2H₂O (44,0 µmol, 3 mol%) wurden zugegeben und die Reaktionslösung 96 h bei Raumtemperatur gerührt. 5%ige

Na₂SO_{3aq} (13 mL) wurden zugegeben und weiter 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Die wässrige Phase wurde mit H₂O (10 mL) verdünnt und mit EtOAc (3 x 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 0,1 M HCl_{aq} (100 mL) und ges. NaCl_{aq} (100 mL) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt (d.r. 19:1) wurde über Kieselgel säulenchromatographisch gereinigt (DCM/MeOH 20:1). **Cbz-Dyp-OBn (13)**, 400 Mg, 73%) wurde als farbloser Feststoff erhalten.

DC: $R_f = 0,43$ (DCM/MeOH 20:1).

¹H-NMR: 300 MHz, 300 K, DMSO-*d*₆ (Hauptisomer angegeben): δ [ppm] = 3.32 (dd, $^2J = 10,5$, $^3J = 3,8$ Hz, 1H, H_δ), 3.51 (dd, $^2J = 10,5$, $^3J = 4,7$ Hz, 1H, H_δ), 3.96-4.10 (m, 3H, H_α, H_β, H_γ), 4.90-5.20 (m, 5H, OH, PhCH₂), 5.57 (d, $^3J = 5,9$ Hz, 1H, OH), 7.13-7.46 (m, 10H, H_{ar}).

Cbz-Dyp(CMe₂)-OBn (14)^[222]

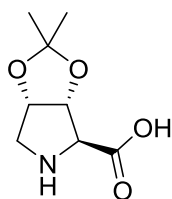


3,80 g **Cbz-Dyp-OBn (13)**, 10,2 mmol, 1,00 Äq.) wurden in DMP (50 mL) gelöst, mit 350 mg *p*-TsOH (2,05 mmol, 0,20 Äq.) und 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Ges. NaHCO_{3aq} (50 mL) wurden zugegeben und weitere 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Die wässrige Phase wurde mit EtOAc (3 x 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl_{aq} (100 mL) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. **Cbz-Dyp(CMe₂)-OBn (14)**, 4,10 g, 97%) wurde als farbloser Feststoff erhalten.

DC: $R_f = 0,73$ (Pentan/EtOAc 3:7).

¹H-NMR: 300 MHz, 300 K, DMSO-*d*₆ (Hauptisomer angegeben): δ [ppm] = 1.26 (s, 3H, CH₃), 1.36 (s, 3H, CH₃), 3.53 (dd, $^2J = 13,0$, $^3J = 4,1$ Hz, 1H, H_δ), 3.73 (d, $^2J = 13,0$ Hz, 1H, H_δ), 4.40 (s, 1H, H_α), 4.77-4.90 (m, 2H, H_β, H_γ), 5.00-5.20 (m, 4H, PhCH₂), 7.18-7.45 (m, 10H, H_{ar}).

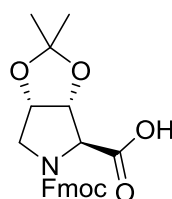
H-Dyp(CMe₂)-OH^[222]



4,10 g **Cbz-Dyp(CMe₂)-OBn (14)**, 9,46 mmol) wurden in EtOAc (60 mL) gelöst und mit 410 mg Pd/C (10 gew%) versetzt. Unter H₂-Atmosphäre (9 bar) wurde 16 h bei Raumtemperatur gerührt. MeOH (60 mL) wurde zugegeben, filtriert und das Lösungsmittel C₈H₁₃NO₄ [187,20] unter vermindertem Druck entfernt. **H-Dyp(CMe₂)-OH** (1,52 g, 82%) wurde als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR: 300 MHz, 300 K, D₂O: δ [ppm] = 1.39 (s, 3H, CH₃), 1.55 (s, 3H, CH₃), 3.54 (dd, ²J = 13.4 Hz, ³J = 4.3 Hz, 1H, H_δ), 3.67 (d, ²J = 13.4 Hz, 1H, H_δ), 4.29 (s, 1H, H_α), 5.09 (dd, ³J = 4.5 Hz, ³J = 5.8 Hz, 1H, H_γ), 5.20 (d, ³J = 5.8 Hz, 1H, H_β).

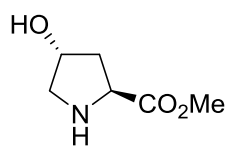
Fmoc-Dyp(CMe₂)-OH (15)^[61, 188, 222]



1,52 g **H-Dyp(CMe₂)-OH** (8,12 mmol, 1,00 Äq.) wurden in 10%iger Na₂CO₃Aq. (12,5 mL) gelöst und mit 2,31 g FmocCl (8,93 mmol, 1,10 Äq.) in 1,4-Dioxan (12,5 mL) versetzt und 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Die wässrige Phase wurde mit C₂₃H₂₃NO₆ [409,44] Et₂O (3 x 25 mL) gewaschen. 1 M HCl wurde bis pH = 6 zugegeben und mit EtOAc (6 x 25 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. **Fmoc-Dyp(CMe₂)-OG (15)**, 2,80 g, 84%) wurde als gelblicher Feststoff erhalten.

¹H-NMR: 300 MHz, 300 K, DMSO-*d*₆ (Hauptisomer angegeben): δ [ppm] = 1.20-.40 (m, 6H, CH₃), 3.45-3.65 (m, 2H, H_δ), 4.05-4.40 (m, 4H, H_α, CO₂CH₂CH), 4.64-4.87 (m, 2H, H_β, H_γ), 7.24-7.46 (m, 4H, H_{ar}), 7.57-7.72 (m, 2H, H_{ar}), 7.82-7.94 (t, ³J = 6,7 Hz, 2H, H_{ar}).

H-Hyp-OMe•HCl^[241]

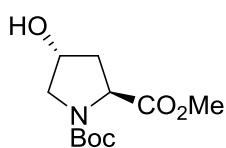


2,00 g **H-Hyp-OH** (15,2 mmol, 1,00 Äq.) wurde in MeOH_{abs} (50 mL) suspendiert und auf 0 °C gekühlt. 1,10 mL SOCl₂ (15,2 mmol, 1,00 Äq.) wurde langsam zugetropft und 19 h bei C₆H₁₁NO₃ [145,16] Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und **H-Hyp-OMe•HCl** (2,78 g, quant.) als weißer Feststoff erhalten.

¹H-NMR: 300 MHz, 300 K, DMSO-*d*₆: δ [ppm] = 2.02-2.24 (m, 2H, H_β), 3.03-3.12 (m, 1H, H_δ), 3.29-3.40 (m, 1H, H_δ), 3.76 (s, 3H, OMe), 4.38-4.50 (m, 1H, H_γ), 4.47 (dd, ³*J* = 10.7, ³*J* = 7.6 Hz, 1H, H_α), 5.56 (d, ³*J* = 3.2 Hz, 1H, OH), 9.69 (s_{br}, 2H, NH₂⁺).

HRMS (ESI(+)): ber. für C₆H₁₁NO₃Na [M+Na]⁺: 146.0812; gef.: 146.0812.

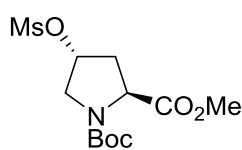
Boc-Hyp-OMe^[242, 352]



2,78 g **H-Hyp-OMe•HCl** (15,2 mmol, 1,00 Äq.) wurde in DCM (30 mL) suspendiert. 373 mg DMAP (3,05 mmol, 0,20 Äq.) und NEt₃ (5 mL) wurden zugegeben und die Reaktionslösung auf 0 °C C₁₁H₁₉NO₅ [245,28] gekühlt. Dann wurden 3,86 g Boc₂O (17,5 mmol, 1,15 Äq.) in DCM (15 mL) langsam zugetropft. Nach 19 h bei Raumtemperatur wurde H₂O (50 mL) zugegeben und die wässrige Phase mit DCM (4 x 30 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 1 M Citronensäure_{aq} (2 x 80 mL) und ges. NaCl_{aq} (80 mL) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde über Kieselgel säulenchromatographisch gereinigt (DCM/MeOH 100:1 □ 10:1). **Boc-Hyp-OMe** (3,12 g, 83%) wurde als farbloses, viskoses Öl erhalten.

¹H-NMR: 300 MHz, 300 K, DMSO-*d*₆ (*trans/cis* 65:35, Hauptisomer angegeben): δ [ppm] = 1.33 (s, 9H, CMe₃), 1.81-1.96 (m, 1H, H_β), 2.04-2.18 (m, 1H, H_β), 3.22-3.30 (m, 1H, H_δ), 3.33-3.45 (m, 1H, H_δ), 3.65 (s, 3H, OMe), 4.15-4.28 (m, 2H, H_γ, H_α), 5.08 (d, ³*J* = 3.3 Hz, 1H, OH).

HRMS (ESI(+)): ber. für C₁₁H₁₉NO₅H [M+H]⁺: 246.1336; gef.: 246.1336.

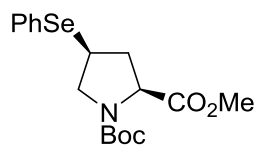
Boc-Hyp(Ms)-OMe (17)^[242]

3,00 g **Boc-Hyp-OMe** (12,2 mmol, 1,00 Äq.) wurde in DCM (50 mL) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Nachdem 2,37 mL NEt₃ (17,1 mmol, 1,40 Äq.) und 448 mg DMAP (3,67 mmol, 0,30 Äq.) zugegeben wurden, wurde 1,33 mL MsCl (17,1 mmol, 1,40 Äq.) langsam zugetropft. Nach 5 h rühren bei Raumtemperatur wurde H₂O (15 mL) zugegeben und weitere 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase mit DCM (3 x 25 mL) extrahiert. Die vereinigten Phasen wurden mit ges. NaCl_{aq} gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde über Kieselgel säulenchromatographisch gereinigt (DCM/MeOH 100:1 → 20:1). **Boc-Hyp(Ms)-OMe (17)**, 3,12 g, quant.) wurde als gelblicher Feststoff erhalten.

DC: R_f = 0,49 (DCM/MeOH 100:1).

¹H-NMR: 300 MHz, 300 K, DMSO-*d*₆ (*trans/cis* 60:40, Hauptisomer angegeben): δ [ppm] = 1.34 (s, 9H, CMe₃), 2.14-2.30 (m, 1H, H _{β}), 2.51-2.60 (m, 1H, H _{β}), 3.26 (s, 3H, OMs), 3.60-3.68 (m, 2H, H _{δ}), 3.69 (s, 3H, OMe), 4.20-4.35 (m, 1H, H _{α}), 5.21-5.30 (m, 1H, H _{γ}).

HRMS (ESI(+)): ber. für C₁₂H₂₁NO₇SNa [M+Na]⁺: 346.0931; gef.: 346.0932.

1-(tert-butyl) 2-methyl (2S,4S)-4-(phenylselanyl)pyrrolidin-1,2-dicarboxylat (18)

2,29 g Ph₂Se₂ (7,35 mmol, 0,60 Äq.) wurden in *tert*-BuOH (40 mL) gelöst und bei 80 °C mit 570 mg NaBH₄ (15,1 mmol, 1,23 Äq.) versetzt. Dann wurde solange unter Rückfluss erhitzt, bis sich die Lösung entfärbte. 15,2 g **Boc-Hyp(Ms)-OMe (17)**, C₁₇H₂₃NO₄Se [384,33] 12,2 mmol, 1,00 Äq.) wurde in *tert*-BuOH (40 mL) zugegeben und 3 h unter Rückfluss erhitzt. EtOAc (100 mL) wurde zugegeben und die organische Phase mit H₂O (150 mL) und ges. NaCl_{aq} (150 mL) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und der Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde über Kieselgel säulenchromatographisch gereinigt

(Cyclohexan/EtOAc 5:1 → 2:1). **1-(tert-butyl) 2-methyl (2S,4S)-4-(phenylselanyl)pyrrolidin-1,2-dicarboxylat (18**, hochviskosen Öl kristallisierten nach einer Zeit messbare Einkristalle aus. 4,00 g, 85%) wurde als gelbliches, hochviskoses Öl erhalten. Aus diesem

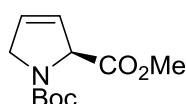
DC: $R_f = 0,66$ (Cyclohexan/EtOAc 2:1).

$^1\text{H-NMR}$: 500 MHz, 300 K, DMSO- d_6 (*trans/cis* 60:40, Hauptisomer angegeben): δ [ppm] = 1.32 (s, 9H, CMe₃), 1.83-1.91 (m, 1H, H _{β}), 2.67-2.73 (m, 1H, H _{β}), 3.18-3.28 (m, 1H, H _{δ}), 3.65 (s, 3H, OMe), 3.78-3.90 (m, 2H, H _{γ} , H _{δ}), 4.23 (t, $^3J = 7.6$ Hz, 1H, H _{α}), 7.30-7.38 (m, 3H, H_{ar}), 7.51-7.56 (m, 2H, H_{ar}).

$^{13}\text{C-NMR}$: 125 MHz, 300 K, DMSO- d_6 (*trans/cis* 60:40, Hauptisomer angegeben): δ [ppm] = 27.8 (C(CH₃)₃), 35.4 (C _{γ}), 37.3 (C _{β}), 51.9 (OMe), 52.3 (C _{δ}), 58.6 (C _{α}), 79.3 (C(CH₃)₃), 127.7 (C_{ar}), 129.4 (C_{ar}), 133.5 (C_{ar}), 133.6 (C_{ar}), 152.3 (CON), 172.4 (CO₂Me).

HRMS (ESI(+)): ber. für C₁₇H₂₃NO₄SeH [M+H]⁺: 386.0866; gef.: 386.0868.

Boc-Dhp-OMe (19)



760 mg **1-(tert-butyl) 2-methyl (2S,4S)-4-(phenylselanyl)pyrrolidin-1,2-dicarboxylat (18**, 2,60 mmol, C₁₁H₁₇NO₄ [227,26] 1.00 Äq.) wurden in DCM (16 mL) gelöst und mit 336 μL Pyridin (4,16 mmol, 1,60 Äq.) versetzt. Dann wurde die Reaktionslösung auf 0 °C gekühlt und 369 μL H₂O₂ (6,50 mmol, 2,50 Äq., 50% in H₂O). Die Reaktionslösung wurde 3 h bei RT gerührt wobei sich die Farbe von farblos zu orange änderte. Nun wurde H₂O (5 mL) zugegeben und mit 1 M Citronensäure (20 mL), ges. Na₂SO_{3aq} (20 mL) und ges. NaCl_{aq} (20 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Kieselgel (DCM → DCM/MeOH 50:1) gereinigt. **Boc-Dhp-OMe (19**, 530 mg, 90%) als farbloses, viskoses Öl erhalten. Aus diesem hochviskosen Öl kristallisierten nach einer Zeit messbare Einkristalle aus.

DC: $R_f = 0,46$ (DCM/MeOH 100:1).

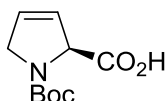
¹H-NMR: 500 MHz, 300 K, DMSO-*d*₆ (*trans/cis* 60:40, Hauptisomer angegeben): δ [ppm] = 1.35 (s, 9H, CMe₃), 3.67 (s, 3H, OMe), 4.04-4.14 (m, 2H, H_δ), 4.89-4.94 (m, 1H, H_α), 5.79 (dddd, ³*J* = 6.3, ³*J* = 2.1, ⁴*J* = 2.1, ⁴*J* = 2.1 Hz, 1H, H_β), 6.09 (dddd, ³*J* = 6.3, ³*J* = 2.1, ³*J* = 2.1, ⁴*J* = 2.1 Hz, 1H, H_γ).

¹³C-NMR: 125 MHz, 300 K, DMSO-*d*₆ (*trans/cis* 60:40, Hauptisomer angegeben): δ [ppm] = 27.8 (C(CH₃)₃), 52.0 (OMe), 53.1 (C_δ), 66.1 (C_α), 79.3 (C(CH₃)₃), 124.6 (C_β), 129.5 (C_γ), 152.5 (NCO₂), 170.6 (CO₂Me).

HRMS (ESI(+)): ber. für C₁₁H₁₇NO₄Na [M+Na]⁺: 250.1050; gef.: 250.1052.

HPLC: *t*_R = 2,3 min (Gradient: 60 → 90% B in 8 min).

Boc-Dhp-OH



500 mg **Boc-Dhp-OMe (19)**, 2,20 mmol, 1,00 Äq.) wurden in THF/H₂O (30 mL) gelöst und mit 105 mg LiOH (4,40 mmol, C₁₀H₁₅NO₄ [213,23] 2,00 Äq.) versetzt. Dann wurde 2h bei Raumtemperatur gerührt. Nun wurde die Reaktionslösung mit 1 M HCl_{aq} auf pH = 2 gebracht und mit EtOAc (3 x 30 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Kieselgel gereinigt (EtOAc + 1% AcOH). **Boc-Dhp-OH** (480 mg, 100%) wurde als gelbliches, viskoses Öl erhalten.

DC: R_f = 0,71 (EtOAc + 1% AcOH).

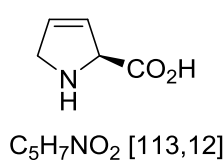
¹H-NMR: 500 MHz, 300 K, DMSO-*d*₆ (*trans/cis* 60:40, Hauptisomer angegeben): δ [ppm] = 1.36 (s, 9H, CMe₃), 4.04-4.12 (m, 2H, H_δ), 4.76-4.98 (m, 1H, H_α), 5.80 (dddd, ³*J* = 6.3, ³*J* = 2.1, ⁴*J* = 2.1, ⁴*J* = 2.1 Hz, 1H, H_β), 6.05 (dddd, ³*J* = 6.3, ³*J* = 2.1, ³*J* = 2.1, ⁴*J* = 2.1 Hz, 1H, H_γ), 12.69 (s_{br}, 1H, COOH).

¹³C-NMR: 125 MHz, 300 K, DMSO-*d*₆ (*trans/cis* 60:40, Hauptisomer angegeben): δ [ppm] = 27.9 (C(CH₃)₃), 53.1 (C_δ), 66.3 (C_α), 78.9 (C(CH₃)₃), 125.2 (C_β), 128.9 (C_γ), 152.7 (NCO₂), 171.5 (CO₂H).

HRMS (ESI(+)): ber. für C₁₀H₁₅NO₄Na [M+Na]⁺: 236.0893; gef.: 236.0893.

HPLC: $t_R = 5,4$ min (Gradient: 10 → 90% B in 8 min).

H-Boc-OH•TFA (20)

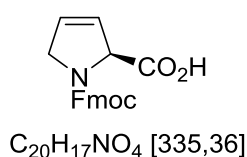


1,20 g **Boc-Dhp-OH** (2,20 mmol, 1,00 Äq.) wurden in DCM/TFA (5:1, 30 mL) gelöst und für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. **H-Dhp-OH•TFA (20, 1,30 g, quant.)** wurde als braunes Öl erhalten.

1H -NMR: 500 MHz, 300 K, DMSO- d_6 : δ [ppm] = 4.00 (ddd, $^2J = 15.4$, $^3J = 4.2$, $^4J = 2.1$ Hz, 1H, H_δ), 4.00 (dddd, $^2J = 15.4$, $^3J = 4.2$, $^4J = 2.1$, $^5J = 2.1$ Hz, 1H, H_δ), 5.10 (m, 1H, H_α), 5.80 (dddd, $^3J = 6.3$, $^3J = 2.1$, $^4J = 2.1$, $^4J = 2.1$ Hz, 1H, H_β), 6.07 (dddd, $^3J = 6.3$, $^3J = 2.1$, $^3J = 2.1$, $^4J = 2.1$ Hz, 1H, H_γ), 9.06 (s_{br}, 1H, NH_2), 10.1 (s_{br}, 1H, NH_2).

^{13}C -NMR: 125 MHz, 300 K, DMSO- d_6 : δ [ppm] = 52.3 (C_δ), 65.8 (C_α), 116.4 ($^3J = 294.6$ Hz, CF_3), 124.4 (C_β), 127.6 (C_γ), 158.2 ($^4J_{F,C} = 33.7$ Hz, F_3CCO), 168.7 (CO_2H).

Fmoc-Dhp-OH (21)



1.15 g **H-Dhp-OH•TFA (20, 5,06 mmol, 1,00 Äq.)** wurden in 10%iger Na_2CO_{3aq} (30 mL) gelöst und mit 1.96 g Fmoc-Cl (7,59 mmol, 1,50 Äq.) in 1,4-Dioxan (10 mL) versetzt. Dann wurde für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit 1 M HCl_{aq} auf pH = 2 gebracht und mit EtOAc (3 x 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über $MgSO_4$ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Kieselgel (DCM/EtOAc 1:1 + 1% AcOH) gereinigt. **Fmoc-Dhp-OH (21, 1,45 g, 85%)** als farbloser Feststoff erhalten

DC: $R_f = 0,45$ (DCM/EtOAc 1:1 + 1% AcOH).

1H -NMR: 500 MHz, 300 K, DMSO- d_6 (*trans/cis* 55:45, Hauptisomer angegeben): δ [ppm] = 4.10-4.38 (m, 5H, 9-H, 10-H, H_δ), 4.85-4.90 (m, 1H, H_α), 5.87 (dddd,

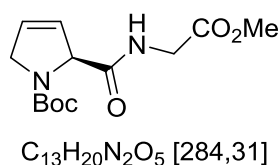
$^3J = 6.3$, $^3J = 2.1$, $^4J = 2.1$, $^4J = 2.1$ Hz, 1H, H_β), 6.10 (dddd, $^3J = 6.3$, $^3J = 2.1$, $^3J = 2.1$, $^4J = 2.1$ Hz, 1H, H_γ), 7.29-7.38 (m, 2H, 2/7-H), 7.39-7.45 (m, 2H, 3/6-H), 7.63-7.70 (m, 2H, 1/8-H), 7.86-7.93 (m, 2H, 4/5-H), 12.70 (s_{br}, 1H, CO₂H).

^{13}C -NMR: 125 MHz, 300 K, DMSO- d_6 (*trans/cis* 55:45, Hauptisomer angegeben): δ [ppm] = 46.6 (9-C), 53.1 (C_δ), 66.5 (C_α), 66.7 (10-C), 120.1 (4/5-C), 120.1 (4/5-C), 125.1 (C_β), 125.2 (1/8-C), 125.3 (1/8-C), 127.2 (4 x 2/7-C), 127.7 (4 x 3/6-C), 129.0 (C_γ), 140.6 (4a/4b-C), 140.7 (4a/4b-C), 143.7 (8a/9a-C), 143.7 (8a/9a-C), 153.4 (NCO₂), 170.8 (CO₂H).

HRMS (ESI(+)): ber. für C₂₀H₁₇NO₄Na [M+Na]⁺: 358.1050; gef.: 358.1051.

HPLC: $t_R = 5.4$ min (Gradient: 40 → 60% B in 20 min).

Boc-Dhp-Gly-OMe (22)



760 mg **Boc-Dhp-OH** (3,56 mmol, 1,00 Äq.), 446 mg **H-Gly-OMe•HCl** (3,56 mmol, 1,00 Äq.), 1,62 g HBTU (4,28 mmol, 1,20 Äq.) und 655 mg HOBt•H₂O (4,28 mmol, 1,20 Äq.) wurden zusammen mit 2.43 mL DIPEA (14,3 mmol, 4,00 Äq.) in DMF (25 mL) gelöst. Dann wurde die Lösung 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Das DMF wurde abkondensiert und der Rückstand in Chloroform aufgenommen. Nun wurde die organische Phase mit ges. NaHCO_{3aq}, 2 M HCl_{aq}, ein weiteres Mal mit ges. NaHCO_{3aq} und ges. NaCl_{aq} gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet, filtriert und der Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Kieselgel gereinigt (EtOAc). **Boc-Dhp-Gly-OMe (22)**, 890 mg, 88%) wurde als farbloser Feststoff erhalten. 100 mg **22** in etwas EtOAc gelöst und mit *n*-Pentan überschichtet lieferten über Nacht farblose, nadelförmige Kristalle.

DC: $R_f = 0.62$ (EtOAc).

^1H -NMR: 500 MHz, 300 K, DMSO- d_6 (*trans/cis* 70:30, Hauptisomer angegeben): δ [ppm] = 1.36 (s, 9H, CMe₃), 3.62 (s, 3H, OMe), 3.79 (dd, $^2J = 17.2$, $^3J = 5.9$ Hz, 1H, Gly-H _{α}), 3.87 (dd, $^2J = 17.2$, $^3J = 5.9$ Hz, 1H, Gly-H _{α}), 4.05-4.15 (m, 2H, Dhp-H _{δ}), 4.79-4.84 (m, 1H, Dhp-H _{α}), 5.69 (dddd, $^3J = 6.3$, $^3J = 2.1$, $^4J = 2.1$, $^4J = 2.1$ Hz, 1H,

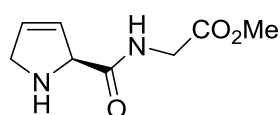
H_β), 5.98 (dddd, ³J = 6.3, ³J = 2.1, ³J = 2.1, ⁴J = 2.1 Hz, 1H, H_γ), 8.37 (d, ³J = 5.9 Hz, 1H, NH).

¹³C-NMR: 125 MHz, 300 K, DMSO-*d*₆ (*trans/cis* 70:30, Hauptisomer angegeben): δ [ppm] = 27.9 (C(CH₃)₃), 40.6 (Gly-C_α), 51.5 (OMe), 53.4 (Dhp-C_δ), 67.4 (Dhp-C_γ), 78.9 (C(CH₃)₃), 126.3 (Dhp-C_β), 127.9 (Dhp-C_γ), 152.7 (Dhp-NCO₂), 170.0 (CO₂Me), 170.2 (CONH).

HRMS (ESI(+)): ber. für C₁₃H₂₀N₂O₅Na [M+Na]⁺: 307.1264; gef.: 307.1274.

HPLC: *t*_R = 4,7 min (Gradient: 10 → 80% B in 5 min).

H-Dhp-Gly-OMe•TFA



C₈H₁₂N₂O₃ [184,20]

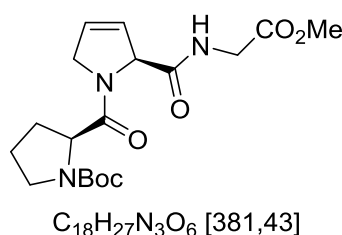
800 mg **Boc-Dhp-Gly-OMe** (2,81 mmol) wurden in DCM/TFA 5:1 (18 mL) gelöst und 2 Stunden bei RT gerührt. Dann wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. **H-Dhp-Gly-OMe•TFA** (quant.) wurde als braunes, viskoses Öl erhalten.

¹H-NMR: 500 MHz, 300 K, DMSO-*d*₆: δ [ppm] = 3.66 (s, 3H, OMe), 4.00 (d, ³J = 5.9 Hz, 2H, Gly-H_α), 4.01-4.10 (m, 2H, Dhp-H_δ), 5.06 (s_{br}, 1H, Dhp-H_α), 5.92 (dddd, ³J = 6.3, ³J = 2.1, ⁴J = 2.1, ⁴J = 2.1 Hz, 1H, H_β), 5.98 (dddd, ³J = 6.3, ³J = 2.1, ³J = 2.1, ⁴J = 2.1 Hz, 1H, H_γ), 8.92 (s_{br}, 1H, NH₂⁺), 9.12 (d, ³J = 5.9 Hz, 1H, NH), 9.88 (s_{br}, 1H, NH₂⁺).

¹³C-NMR: 125 MHz, 300 K, DMSO-*d*₆: δ [ppm] = 40.6 (Gly-C_α), 51.9 (OMe), 52.5 (Dhp-C_δ), 66.0 (Dhp-C_α), 115.9 (q, ³J = 293.4 Hz, CF₃), 125.1 (Dhp-C_β), 127.4 (Dhp-C_γ), 158.2 (q, ⁴J = 35.4 Hz, CCF₃), 166.7 (CONH), 169.6 (CO₂Me).

HRMS (ESI(+)): ber. für C₈H₁₂N₂O₃H [M+H]⁺: 185.0921; gef.: 185.0924.

HPLC: *t*_R = 2,0 min (Gradient: 2 → 20% B in 8 min).

Boc-Pro-Dhp-Gly-OMe (23)

516 mg **H-Dhp-Gly-OMe** TFA (2,80 mmol, 1,00 Äq.), 603 mg **Boc-Pro-OH** (2,80 mmol, 1,00 Äq.), 1,78 g HATU (3,36 mmol, 1,20 Äq.) und 457 mg HOAt (3,36 mmol, 1,20 Äq.) wurden zusammen mit 2,86 mL DIPEA (16,8 mmol, 6,00 Äq.) in DMF (25 mL) gelöst. Dann wurde die Lösung 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Das DMF wurde abkondensiert und der Rückstand in Chloroform aufgenommen. Nun wurde die organische Phase mit ges. $NaHCO_{3aq}$, 2 M HCl_{aq} , ein weiteres Mal mit ges. $NaHCO_{3aq}$ und ges. $NaCl_{aq}$ gewaschen. Die organische Phase wurde über $MgSO_4$ getrocknet, filtriert und der Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Kieselgel gereinigt (EtOAc/MeOH 10:1). **Boc-Pro-Dhp-Gly-OMe (23)**, 854 mg, 80%) wurde als farbloser Feststoff erhalten.

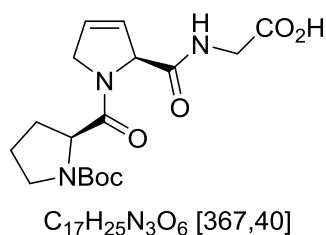
DC: $R_f = 0,54$ (EtOAc/MeOH 10:1).

1H -NMR: 500 MHz, 300 K, $DMSO-d_6$ (4 Isomere: 59:36:3:2; Hauptisomer angegeben): δ [ppm] = 1.27 (s, 9H, CMe_3), 1.70-1.80 (m, 1H, Pro- H_γ), 1.80-1.90 (m, 2H, Pro- H_β , Pro- H_γ), 2.10-2.25 (m, 1H, Pro- H_β), 3.25-3.37 (m, 2H, Pro- H_δ), 3.61 (s, 3H, OMe), 3.79 (dd, $^2J = 17.4$, $^3J = 5.7$ Hz, 1H, Gly- H_α), 3.88 (dd, $^2J = 17.4$, $^3J = 6.1$ Hz, 1H, Gly- H_α), 4.24-4.50 (m, 3H, Dhp- H_δ , Pro- H_α), 5.00-5.05 (m, 1H, Dhp- H_α), 5.75-5.81 (m, 1H, Dhp- H_β), 6.01-6.10 (m, 1H, Dhp- H_γ), 8.33 (t, $^3J = 6.0$ Hz, 1H, NH).

^{13}C -NMR: 125 MHz, 300 K, $DMSO-d_6$ (4 Isomere: 59:36:3:2; Hauptisomer angegeben): δ [ppm] = 23.3 (Pro- C_γ), 27.9 ($C(CH_3)_3$), 29.5 (Pro- C_β), 40.5 (Gly- C_α), 46.5 (Pro- C_δ), 51.7 (OMe), 53.5 (Dhp- C_δ), 57.0 (Pro- C_α), 67.0 (Dhp- C_α), 78.4 ($C(CH_3)_3$), 125.9 (Dhp- C_β), 127.8 (Dhp- C_γ), 152.9 (Pro- NCO_2), 169.3 (Dhp-CONH), 170.1 (CO_2Me), 170.7 (Pro-CONH).

HRMS (ESI(+)): ber. für $C_{18}H_{27}N_3O_6Na$ $[M+Na]^+$: 404.1792; gef.: 404.1794.

HPLC: $t_R = 4,7$ min (Gradient: 10 \rightarrow 80% B in 5 min).

Boc-Pro-Dhp-Gly-OH

690 mg **Boc-Pro-Dhp-Gly-OMe (23)**, 1,81 mmol, 1,00 Äq.) wurden in THF/H₂O 1:1 (40 mL) gelöst und mit 160 mg LiOH·H₂O (3,62 mmol, 2,00 Äq.) versetzt. Die Lösung wurden nun 1,5 h bei Raumtemperatur gerührt, wobei sich die Farbe der Reaktionslösung von farblos zu gelb änderte.

Dann wurde die Reaktionslösung mit 1 M HCl_{aq} angesäuert und die wässrige Phase mit EtOAc (3 x 75 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

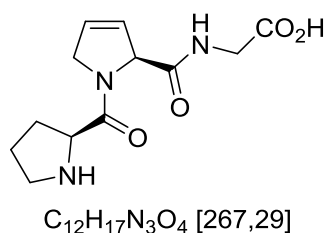
Boc-Pro-Dhp-Gly-OH (551 mg, 81%) wurde als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR: 500 MHz, 300 K, DMSO-*d*₆ (4 Isomere: 45:35:10:10; Hauptisomer angegeben): δ [ppm] = 1.27 (s, 9H, CMe₃), 1.70-1.80 (m, 1H, Pro-H_γ), 1.80-1.89 (m, 2H, Pro-H_β, Pro-H_γ), 2.13-2.21 (m, 1H, Pro-H_β), 3.25-3.35 (m, 2H, Pro-H_γ), 3.70 (dd, ²*J* = 17.6, ³*J* = 5.8 Hz, 1H, Gly-H_α), 3.79 (dd, ²*J* = 17.6, ³*J* = 6.0 Hz, 1H, Gly-H_α), 4.32-4.35 (m, 1H, Dhp-H_δ), 4.35-4.40 (m, 2H, Dhp-H_δ, Pro-H_α), 5.00-5.06 (m, 1H, Dhp-H_α), 5.76-5.88 (m, 1H, Dhp-H_β), 6.01-6.05 (m, 1H, Dhp-H_γ), 8.22 (t, ³*J* = 5.9 Hz, 1H, NH), 12.56 (s_{br}, 1H, COOH).

¹³C-NMR: 125 MHz, 300 K, DMSO-*d*₆ (4 Isomere: 45:35:10:10; Hauptisomer angegeben): δ [ppm] = 23.3 (Pro-C_γ), 27.9 (C(CH₃)₃), 29.5 (Pro-C_β), 40.6 (Gly-C_α), 46.5 (Pro-C_δ), 53.5 (Dhp-C_δ), 57.0 (Pro-C_α), 67.0 (Dhp-C_α), 78.4 (C(CH₃)₃), 126.1 (Dhp-C_β), 127.7 (Dhp-C_γ), 152.9 (Pro-NCO₂), 169.1 (Dhp-CONH), 170.7 (Pro-CONH), 171.1 (CO₂H).

HRMS (ESI(+)): ber. für C₁₇H₂₅N₃O₆H [M+H]⁺: 368.1816; gef.: 368.1816.

HPLC: *t*_R = 4,4 min (Gradient: 10 → 80% B in 5 min).

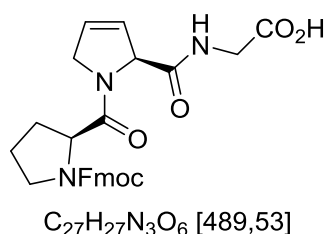
H-Pro-Dhp-Gly-OH•TFA

551 mg **Boc-Pro-Dhp-Gly-OH** (1,50 mmol, 1,00 Äq.) wurden in DCM (40 mL) gelöst und mit TFA (8 mL) versetzt. Dann wurde 3 h bei Raumtemperatur gerührt und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in H_2O aufgenommen und lyophilisiert. **H-Pro-Dhp-Gly-OH•TFA** (quant.) wurde als brauner Feststoff erhalten.

1H -NMR: 500 MHz, 300 K, $DMSO-d_6$ (*trans/cis* 75:25, Hauptisomer angegeben): δ [ppm] = 1.76-2.02 (m, 3H, Pro- H_γ , Pro- H_β), 2.34-2.49 (m, 1H, Pro- H_β), 3.08-3.22 (m, 1H, Pro- H_δ), 3.22-3.32 (m, 1H, Pro- H_δ), 3.72 (dd, $^2J = 17.7$, $^3J = 5.6$ Hz, 1H, Gly- H_α), 3.80 (dd, $^2J = 17.7$, $^3J = 6.0$ Hz, 1H, Gly- H_α), 4.31 (d, $^2J = 14.5$ Hz, 1H, Dhp- H_δ), 4.43 (d, $^2J = 14.5$ Hz, 1H, Dhp- H_δ), 4.47-4.57 (m, 1H, Pro- H_α), 5.09-5.16 (m, 1H, Dhp- H_α), 5.78-5.86 (m, 1H, Dhp- H_β), 6.02-6.13 (m, 1H, Dhp- H_γ), 8.41 (t, $^3J = 5.6$ Hz, 1H, NH).

^{13}C -NMR: 125 MHz, 300 K, $DMSO-d_6$ (*trans/cis* 75:25, Hauptisomer angegeben): δ [ppm] = 23.6 (Pro- C_γ), 27.7 (Pro- C_β), 40.7 (Gly- C_α), 45.8 (Pro- C_δ), 53.3 (Dhp- C_δ), 58.2 (Pro- C_α), 67.4 (Dhp- C_α), 117.1 (q, $^2J = 298$ Hz, CF_3), 125.7 (Dhp- C_β), 127.6 (Dhp- C_γ), 158.4 (q, $^3J = 32$ Hz, F_3CCO_2), 166.7 (Pro-CON), 168.5 (Dhp-CON), 171.0 (CO_2H).

HRMS (ESI(+)): ber. für $C_{12}H_{18}N_3O_4H$ $[M+H]^+$: 268.1292; gef.: 268.1293.

Fmoc-Pro-Dhp-Gly-OH (24)

559 mg **H-Pro-Dhp-Gly-OH•TFA** (1,47 mmol, 1,00 Äq.) wurden in 10%iger Na_2CO_{3aq} (20 mL) gelöst. 420 mg Fmoc-Cl (1,61 mmol, 1,10 Äq.) wurden in 1,4-Dioxan (20 mL) zugegeben. Die Reaktionslösung wurde 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach dem Waschen mit EtOAc

wurde 5 M HCl_{aq} zugeben bis pH = 2 erreicht wurde und die wässrige Phase mit EtOAc (4 x 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über $MgSO_4$ getrocknet, filtriert und der Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

Fmoc-Pro-Dhp-Gly-OH (24, 630 mg, 88%) wurde als farbloser Schaum erhalten.

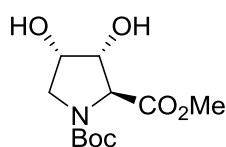
DC: $R_f = 0,40$ (EtOAc/MeOH 9:1).

$^1\text{H-NMR}$: 500 MHz, 300 K, DMSO- d_6 (Hauptisomer angegeben): δ [ppm] = 1.70-1.97 (m, 3H, Pro- H_γ , Pro- H_β), 2.11-2.22 (m, 1H, Pro- H_β), 3.29-3.48 (m, 2H, Pro- H_δ), 3.66 (dd, $^2J = 17.6$, $^3J = 5.6$ Hz, 1H, Gly- H_α), 3.78 (dd, $^2J = 17.6$, $^3J = 6.0$ Hz, 1H, Gly- H_α), 3.91-4.59 (m, 6H, Pro- H_α , Dhp- H_δ , Fmoc- H_9 , Fmoc- CH_2), 4.90-4.95 (m, 1H, Dhp- H_α), 5.76-5.82 (m, 1H, Dhp- H_β), 5.98-6.05 (m, 1H, Dhp- H_γ), 7.23-7.46 (m, 4H, H_{ar}), 7.50-7.58 (m, 1H, H_{ar}), 7.62-7.69 (m, 1H, H_{ar}), 7.80-7.93 (m, 2H, H_{ar}), 8.17 (t, $^3J = 5.6$ Hz, 1H, NH).

$^{13}\text{C-NMR}$: 125 MHz, 300 K, DMSO- d_6 (Hauptisomer angegeben): δ [ppm] = 22.9 (Pro- C_γ), 29.4 (Pro- C_β), 41.3 (Gly- C_α), 47.3 (Fmoc- C_9), 47.4 (Pro- C_δ), 53.4 (Dhp- C_δ), 57.5 (Pro- C_α), 66.5 (Fmoc- C_{10}), 67.5 (Dhp- C_α), 120.5 (Fmoc-CH), 124.9 (Fmoc-CH), 126.0 (Dhp- C_β), 127.3 (Fmoc-CH), 128.0 (Fmoc-CH), 128.2 (Dhp- C_γ), 154.0 (Pro- NCO_2), 169.1 (Dhp-CON), 169.8 (Pro-CON), 171.4 (CO_2H).

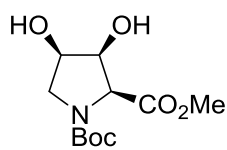
HRMS (ESI(+)): ber. für $\text{C}_{27}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_6\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 512.1792; gef.: 512.1795.

Boc-Dyp-OMe (25a)^[220]



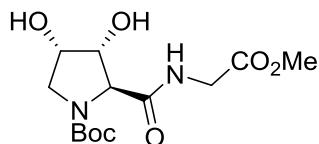
107 mg **Boc-Dhp-OMe (19)**, 500 μmol , 1,00 Äq.) wurden in $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ (4:1, 10 mL) gelöst und mit 77,9 mg NMO (665 μmol , 1,33 Äq.), 78,8 mg Citronensäure $\cdot\text{H}_2\text{O}$ (375 μmol , 0,75 Äq.) und $\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{NO}_6$ [261,27] 1,84 mg $\text{K}_2\text{OsO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (5,00 μmol , 1 mol%) versetzt. Nach 1,5 h bei Raumtemperatur wurde die wässrige Phase mit EtOAc (4 x 25 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet, filtriert und der Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. **Boc-Dyp-OMe (25a)** wurde zusammen mit dem entsprechenden Diastereomer (**25b**) als farbloser Feststoff erhalten (113 mg, 92%, d.r. 82:18).

$^1\text{H-NMR}$: 500 MHz, 300 K, CDCl_3 (*trans/cis* 63:37, d.r. 82:18, Hauptisomer angegeben): δ [ppm] = 1.35 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 3.47 (dd, $^2J = 11.6$, $^3J = 3.6$ Hz, 1H, H_δ), 3.57-3.65 (m, 1H, H_δ), 3.73 (s, 3H, OMe), 4.10 (d, $^3J = 5.2$ Hz, 1H, H_α), 4.14-4.24 (m, 2H, H_β , H_γ).

Boc-dyp-OMe (25b)^[220]

107 mg **Boc-Dhp-OMe (19)**, 500 μmol , 1,00 Äq.) wurden in $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ (4:1, 10 mL) gelöst und mit 77,9 mg NMO (665 μmol , 1,33 Äq.), 78,8 mg Citronensäure $\cdot\text{H}_2\text{O}$ (375 μmol , 0,75 Äq.) und $\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{NO}_6$ [261,27] 1,84 mg $\text{K}_2\text{OsO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (5,00 μmol , 1 mol%) versetzt. Nach 1,5 h bei Raumtemperatur wurde die wässrige Phase mit EtOAc (4 x 25 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet, filtriert und der Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. **Boc-dyp-OMe (25b)** wurde zusammen mit dem entsprechenden Diastereomer (**25a**) als farbloser Feststoff erhalten (113 mg, 92%, d.r. 18:82).

$^1\text{H-NMR}$: 500 MHz, 300 K, CDCl_3 (*trans/cis* 60:40, d.r. 18:82, Hauptisomer angegeben): δ [ppm] = 1.37 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 3.52-3.65 (m, 2H, H_δ), 3.76 (s, 3H, OMe), 4.08-4.13 (m, 1H, H_α), 4.30-4.45 (m, 2H, H_β , H_γ).

Boc-Dyp-Gly-OMe (26a)

142 mg **Boc-Dyp-Gly-OMe (22)**, 500 μmol , 1,00 Äq.) wurden in $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ (4:1, 10 mL) gelöst und mit 77,9 mg NMO (665 μmol , 1,33 Äq.), 78,8 mg Citronensäure $\cdot\text{H}_2\text{O}$ (375 μmol , 0,75 Äq.) und 1,84 mg $\text{K}_2\text{OsO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (5,00 μmol , 1 mol%) versetzt. Nach 2 h bei Raumtemperatur wurde die wässrige Phase lyophilisiert. Der Rückstand wurde mittels semipräparativer RP-HPLC gereinigt. **Boc-Dyp-Gly-OMe (26a)**, 120 mg, 76%) konnte als farbloser Feststoff erhalten werden.

$^1\text{H-NMR}$: 500 MHz, 300 K, $\text{DMSO}-d_6$ (*trans/cis* 64:36, Hauptisomer angegeben): δ [ppm] = 1.32 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 3.13 (dd, $^2J = 10.5$, $^3J = 6.2$ Hz, 1H, Dyp- H_δ), 3.45 (dd, $^2J = 10.5$, $^3J = 6.1$ Hz, 1H, Dyp- H_δ), 3.62 (s, 3H, OMe), 3.78 (dd, $^2J = 17.4$, $^3J = 6.0$ Hz, 1H, Gly- H_α), 3.82 (dd, $^2J = 17.4$, $^3J = 6.0$ Hz, 1H, Gly- H_α), 3.87 (dd, $^3J = 3.6$, $^3J = 3.6$ Hz, 1H, Dyp- H_β), 3.91 (d, $^3J = 3.5$ Hz, Dyp- H_α), 4.03 (ddd, $^3J = 6.2$, $^3J = 6.2$, $^3J = 3.9$ Hz, 1H, Dyp- H_γ), 8.40 (t, $^3J = 6.0$ Hz, 1H, NH).

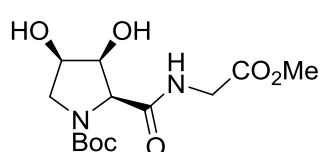
$^{13}\text{C-NMR}$: 125 MHz, 300 K, $\text{DMSO}-d_6$ (*trans/cis* 64:36, Hauptisomer angegeben): δ [ppm] = 27.9 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 40.7 (Gly- C_α), 49.9 (Dyp- C_δ), 51.7 (OMe), 66.3 (Dyp- C_α),

69.1 (Dyp-C_γ), 75.2 (Dyp-C_β), 78.7 (C(CH₃)₃), 153.5 (Dyp-NCO₂), 170.1 (CO₂Me), 171.1 (Dyp-CON).

HRMS (ESI(+)): ber. für C₁₃H₂₂N₂O₇Na [M+Na]⁺: 341.1319; gef.: 341.1318.

HPLC: *t_R* = 3,7 min (Gradient: 10 → 90% B in 8 min).

Boc-dyp-Gly-OMe (26b)



142 mg **Boc-Dhp-Gly-OMe (22)**, 500 μmol, 1,00 Äq.) wurden in H₂O/MeCN (4:1, 10 mL) gelöst und mit 77,9 mg NMO (665 μmol, 1,33 Äq.), 78,8 mg Citronensäure•H₂O (375 μmol, 0,75 Äq.) und 1,84 mg K₂OsO₄•2H₂O (5,00 μmol, 1 mol%) versetzt. Nach 2 h bei Raumtemperatur wurde die wässrige Phase lyophilisiert. Der Rückstand wurde mittels semipräparativer RP-HPLC gereinigt. **Boc-dyp-Gly-OMe (26b)**, 10,3 mg, 7%) konnte als farbloser Feststoff erhalten werden.

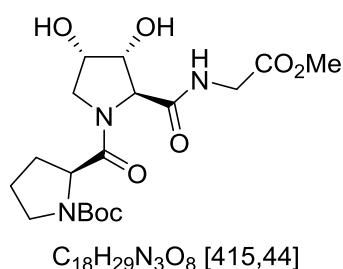
¹H-NMR: 500 MHz, 300 K, DMSO-*d*₆ (*trans/cis* 64:36, Hauptisomer angegeben): δ [ppm] = 1.34 (s, 9H, C(CH₃)₃), 3.24 (dd, ²*J* = 10.8, ³*J* = 5.4 Hz, 1H, dyp-H_δ), 3.43 (dd, ²*J* = 10.5, ³*J* = 5.4 Hz, 1H, dyp-H_δ), 3.63 (s, 3H, OMe), 3.88 (d, ³*J* = 5.6 Hz, 2H, Gly-H_α), 3.91 (ddd, ³*J* = 4.2, ³*J* = 4.5, ³*J* = 5.5 Hz, 1H, dyp-H_γ), 4.19 (d, ³*J* = 7.0 Hz, dyp-H_α), 4.22 (dd, ³*J* = 7.0, ³*J* = 3.9 Hz, 1H, dyp-H_β), 8.33 (t, ³*J* = 5.6 Hz, 1H, NH).

¹³C-NMR: 125 MHz, 300 K, DMSO-*d*₆ (*trans/cis* 64:36, Hauptisomer angegeben): δ [ppm] = 27.8 (C(CH₃)₃), 40.8 (Gly-C_α), 51.4 (OMe), 51.6 (dyp-C_δ), 62.9 (dyp-C_α), 70.0 (dyp-C_γ), 71.7 (dyp-C_β), 79.0 (C(CH₃)₃), 153.6 (dyp-NCO₂), 170.0 (CO₂Me), 170.7 (dyp-CON).

HRMS (ESI(+)): ber. für C₁₃H₂₂N₂O₇Na [M+Na]⁺: 341.1319; gef.: 341.1320.

HPLC: *t_R* = 4,1 min (Gradient: 10 → 90% B in 8 min).

Boc-Pro-Dyp-Gly-OMe (27a)



191 mg **Boc-Pro-Dhp-Gly-OMe (23)**, 500 μ mol, 1,00 Äq.) wurden in $H_2O/MeCN$ (4:1, 10 mL) gelöst und mit 77,9 mg NMO (665 μ mol, 1,33 Äq.), 78,8 mg Citronensäure $\cdot H_2O$ (375 μ mol, 0,75 Äq.) und 1,84 mg $K_2OsO_4\cdot 2H_2O$ (5,00 μ mol, 1 mol%) versetzt. Nach 2,5 h bei Raumtemperatur wurde die wässrige Phase lyophilisiert.

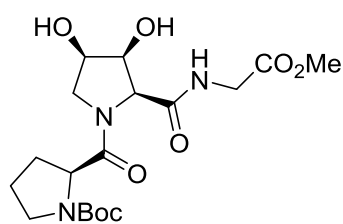
Der Rückstand wurde mittels semipräparativer RP-HPLC gereinigt. **Boc-Pro-Dyp-Gly-OMe (27a)**, 159 mg, 77%) konnte als farbloser Feststoff erhalten werden

1H -NMR: 500 MHz, 300 K, $DMSO-d_6$ (4 Isomere: 55:29:8:8, Hauptisomer angegeben): δ [ppm] = 1.31 (s, 9H, CMe_3), 1.65-1.85 (m, 3H, Pro- H_γ , Pro- H_β), 2.08-2.25 (m, 1H, Pro- H_β), 3.20-3.45 (m, 3H, Pro- H_δ Dyp- H_δ), 3.62 (s, 3H, OMe), 3.64-3.71 (m, 1H, Dyp- H_δ), 3.76 (dd, $^2J = 17.4$, $^3J = 5.8$ Hz, 1H, Gly- H_α), 3.86 (dd, $^2J = 17.4$, $^3J = 5.8$ Hz, 1H, Gly- H_α), 3.92 (dd, $^3J = 3.9$, $^3J = 1.9$ Hz, 1H, Dyp- H_β), 4.12-4.15 (m, 2H, Dyp- H_α , Dyp- H_γ), 4.34 (dd, $^3J = 8.6$, $^3J = 3.4$ Hz, 1H, Pro- H_α), 8.26 (t, $^3J = 5.8$ Hz, 1H, NH).

^{13}C -NMR: 125 MHz, 300 K, $DMSO-d_6$ (4 Isomere: 55:29:8:8, Hauptisomer angegeben): δ [ppm] = 22.9 (Pro- C_γ), 28.0 ($C(CH_3)_3$), 29.4 (Pro- C_β), 40.5 (Gly- C_α), 46.3 (Pro- C_δ), 49.5 (Dyp- C_δ), 51.6 (OMe), 57.2 (Pro- C_α), 66.4 (Dyp- C_α), 70.0 (Dyp- C_ψ), 72.9 (Dyp- C_β), 78.3 ($C(CH_3)_3$), 153.1 (Pro- NCO_2), 170.0 (Pro-CON), 170.1 (CO_2Me), 171.4 (Dyp-CON).

HRMS (ESI(+)): ber. für $C_{18}H_{29}N_3O_8Na$ $[M+Na]^+$: 438.1847; gef.: 438.1853.

HPLC: t_R = 4,5 min (Gradient: 10 \rightarrow 90% B in 8 min).

Boc-Pro-dyp-Gly-OMe (27b)C₁₈H₂₉N₃O₈ [415,44]

191 mg **Boc-Pro-Dhp-Gly-OMe (23)**, 500 μ mol, 1,00 Äq.) wurden in H₂O/MeCN (4:1, 10 mL) gelöst und mit 77,9 mg NMO (665 μ mol, 1,33 Äq.), 78,8 mg Citronensäure•H₂O (375 μ mol, 0,75 Äq.) und 1,84 mg K₂OsO₄•2H₂O (5,00 μ mol, 1 mol%) versetzt. Nach 2,5 h bei Raumtemperatur wurde die wässrige Phase lyophilisiert.

Der Rückstand wurde mittels semipräparativer RP-HPLC gereinigt. **Boc-Pro-dyp-Gly-OMe (27b)**, 3,54 mg, 2%) konnte als farbloser Feststoff erhalten werden

¹H-NMR: 500 MHz, 300 K, DMSO-*d*₆ (4 Isomere: 33:31:23:13, Hauptisomer angegeben): δ [ppm] = 1.31 (s, 9H, CMe₃), 1.65-1.95 (m, 3H, Pro-H _{β} , Pro-H _{γ}), 2.06-2.23 (m, 1H, Pro-H _{β}), 3.20-3.40 (m, 3H, Pro-H _{γ} , dyp-H _{γ}), 3.62 (s, 3H, OMe), 3.70 (dd, ²*J* = 17.4, ³*J* = 5.8 Hz, 1H, Gly-H _{α}), 3.71-3.74 (m, 1H, dyp-H _{δ}), 3.91 (dd, ²*J* = 17.4, ³*J* = 5.8 Hz, 1H, Gly-H _{α}), 3.91-3.94 (m, 1H, dyp-H _{β}), 4.14 (d, ³*J* = 2.0 Hz, 1H, dyp-H _{α}), 4.22 (dd, ³*J* = 4.0, ³*J* = 7.0 Hz, 1H, dyp-H _{γ}), 4.37 (dd, ³*J* = 8.7, ³*J* = 3.7 Hz, 1H, Pro-H _{α}), 8.39 (t, ³*J* = 5.8 Hz, 1H, NH).

¹³C-NMR: 125 MHz, 300 K, DMSO-*d*₆ (4 Isomere: 33:31:23:13, Hauptisomer angegeben): δ [ppm] = 22.9 (Pro-C _{γ}), 27.7 (C(CH₃)₃), 29.6 (Pro-C _{β}), 40.5 (Gly-C _{α}), 46.6 (Pro-C _{δ}), 49.8 (dyp-C _{δ}), 51.7 (OMe), 57.5 (Pro-C _{α}), 66.1 (dyp-C _{α}), 70.0 (dyp-C _{γ}), 73.0 (dyp-C _{β}), 78.6 (CMe₃), 153.0 (Pro-NCO₂), 170.0 (Pro-CON), 170.0 (CO₂Me), 171.9 (dyp-CON).

HRMS (ESI(+)): ber. für C₁₈H₂₉N₃O₈Na [M+Na]⁺: 438.1847; gef.: 438.1853.

HPLC: *t*_R = 4,8 min (Gradient: 10 → 90% B in 8 min).

Ac-(Pro-Hyp-Gly)₃-Pro-Dhp-Gly-(Pro-Hyp-Gly)₃-NH₂ (28)

Ac-(Pro-Hyp-Gly)₃-Pro-Dhp-Gly-(Pro-Hyp-Gly)₃-NH₂ (28) wurde nach der *allgemeinen Vorschrift 1* in einer Ansatzgröße von 0,05 mm auf Rink-Amid-Harz (B = 0,35 mmol/g, 100-200 mesh) synthetisiert. Nach einer N-terminalen Acetylierung mit 30,0 Äq. DIPEA und 30,0 Äq. Ac₂O erfolgte die Abspaltung vom Harz nach der *allgemeinen Vorschrift 4*. Nach Reinigung mittels semipräparativer RP-HPLC (2 → 20 B in 60 min bei 50 °C) wurde **28** (23,7 mg, 25%) als farbloser Feststoff erhalten.

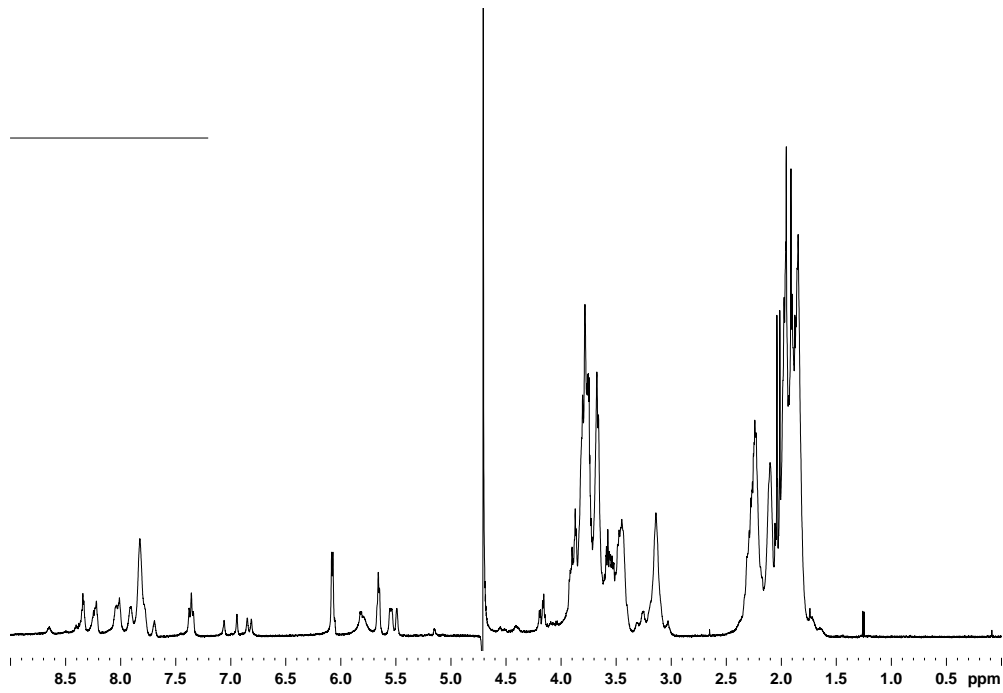
¹H-NMR: 600 MHz, 300 K, H₂O/D₂O 9:1 (Tripelhelix): δ [ppm] = 1.77-2.06 (m, 90H, Pro-H_β, Pro-H_γ, Hyp-H_β, Ac), 2.07-2.33 (m, 39H, Hyp-H_β, Pro-H_β), 3.00-3.30 (m, 21H, Pro-H_δ), 3.38-3.60 (m, 21H, Pro-H_δ), 3.63-3.93 (m, 78H, Gly-H_α, Hyp-H_δ), 4.35-4.45 (m, 3H, Dhp-H_δ), 4.50-4.76 (m, 60H, Hyp-H_γ, Pro-H_α, Hyp-H_α, Dhp-H_δ), 5.45-5.58 (m, 3H, Dhp-H_α), 5.62-5.67 (m, 3H, Dhp-H_γ), 6.02-6.10 (m, 3H, Dhp-H_β), 6.81 (s, 1H, NH₂), 6.85 (s, 1H, NH₂), 6.95 (s, 1H, NH₂), 7.27-7.43 (m, 3H, NH₂), 7.74-8.30 (m, 21H, Gly-NH).

¹H-NMR: 500 MHz, 350 K, H₂O/D₂O 9:1 (Einzelstrang): δ [ppm] = 1.76-2.10 (m, 30H, Pro-H_β, Pro-H_γ, Hyp-H_β, Ac), 2.19-2.44 (m, 13H, Hyp-H_β, Pro-H_β), 3.41-3.69 (m, 14H, Pro-H_δ), 3.70-3.94 (m, 19H, Gly-H_α, Hyp-H_δ), 4.14-4.22 (m, 7H, Gly-H_α), 4.51-4.86 (m, 21H, Hyp-H_α, Hyp-H_γ, Dhp-H_δ, Pro-H_α), 5.10-5.20 (m, 1H, Dhp-H_α), 5.79-5.89 (m, 1H, Dhp-H_γ), 6.03-6.13 (m, 1H, Dhp-H_β), 7.83-8.40 (m, 7H, Gly-NH).

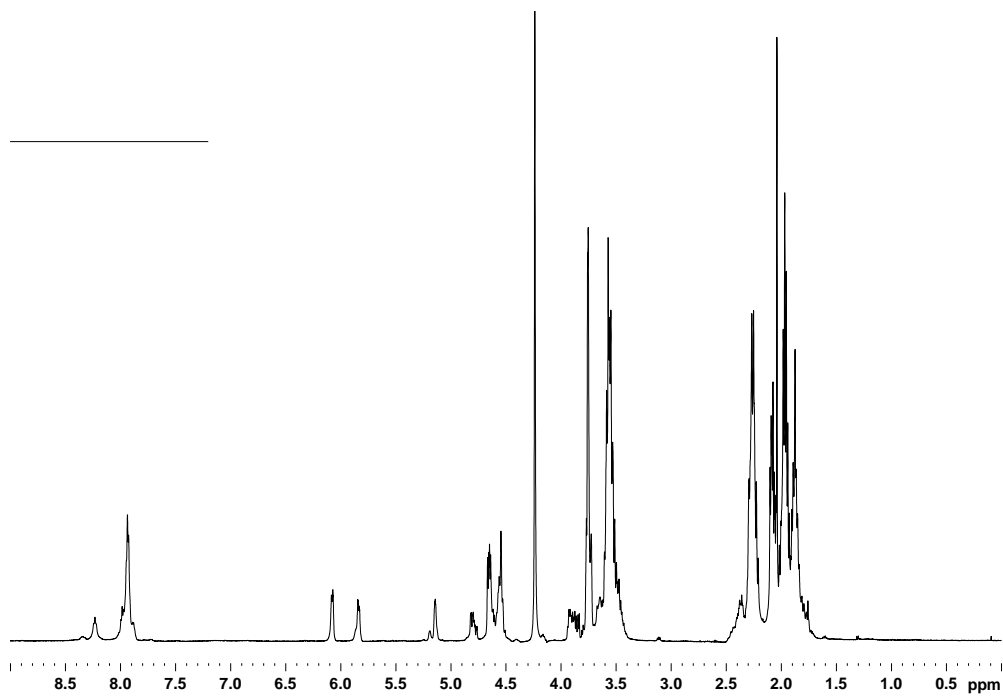
HRMS (ESI(+)): ber. für C₈₆H₁₂₂N₂₂O₂₈Na₂ [M+2Na]²⁺: 978.9307; gef.: 978.9321.

HPLC: t_R = 4,7 min (Gradient: 10 → 30% B in 15 min bei 60 °C).

Experimenteller Teil



^1H -NMR: 600 MHz, 300 K, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1 (Tripelhelix)



^1H -NMR: 500 MHz, 350 K, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1 (Einzelstrang)

Ac-(Pro-Hyp-Gly)₃-Pro-Dyp-Gly-(Pro-Hyp-Gly)₃-NH₂ (29)

1,00 mg **28** (523 nmol, 1,00 Äq.) wurden zusammen mit 39,0 µg K₂OsO₄•2H₂O (105 nmol, 0,20 Äq.), 81,0 µg NMO (696 nmol, 1,33 eq) und 82,0 mg Citronensäure•H₂O (392 nmol, 0,75 Äq.) wurden in H₂O (500 µL) gelöst. Nach 6 h bei 60 °C wurde die Reaktionslösung mittels semipräparativer RP-HPLC (Gradient: 2 → 30% B in 60 min bei 50 °C) gereinigt. **29** (999 µg, 98%) wurde als farbloser Feststoff erhalten.

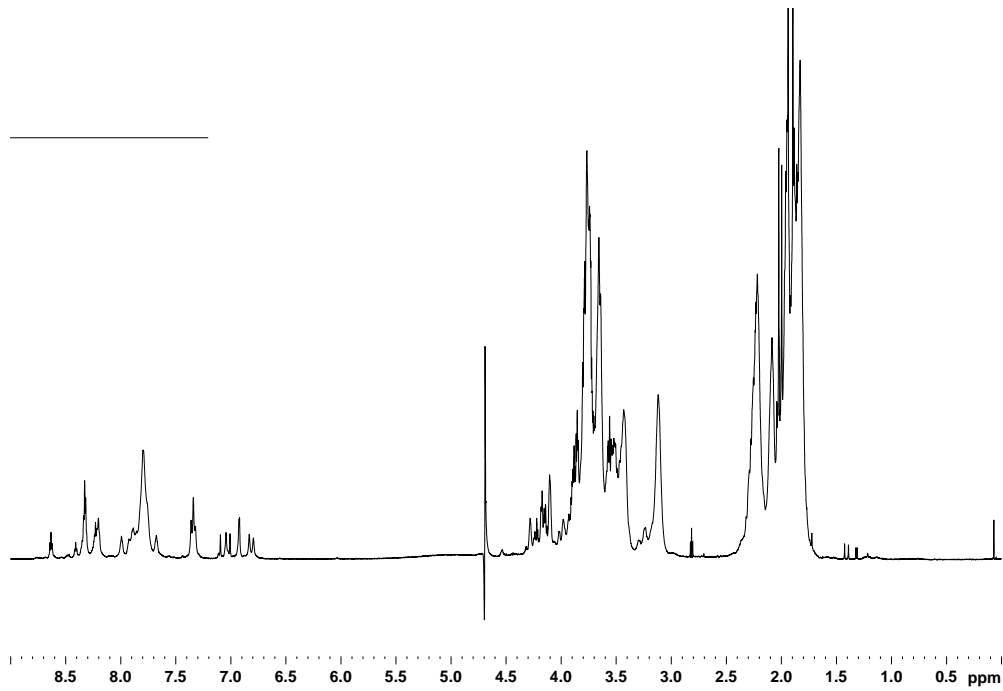
¹H-NMR: 600 MHz, 300 K, H₂O/D₂O 9:1 (Tripelhelix): δ [ppm] = 1.77-2.04 (m, 90H, Pro-H_β, Pro-H_γ, Hyp-H_β, Ac), 2.05-2.35 (m, 39H, Hyp-H_β, Pro-H_β), 3.00-3.30 (m, 21H, Pro-H_δ), 3.38-3.60 (m, 21H, Pro-H_δ), 3.63-3.93 (m, 84H, Gly-H_α, Hyp-H_δ, Dyp-H_δ), 4.07-4.31 (m, 9H, Dyp-H_α, Dyp-H_β, Dyp-H_δ), 4.46-4.74 (m, 57H, Hyp-H_α, Pro-H_α, Hyp-H_γ), 6.79 (s, 1H, NH₂), 6.84 (s, 1H, NH₂), 6.93 (s, 1H, NH₂), 7.27-7.41 (m, 3H, NH₂), 7.76-8.30 (m, 21H, Gly-NH).

¹H-NMR: 500 MHz, 350 K, H₂O/D₂O 9:1 (Einzelstrang): δ [ppm] = 1.76-2.12 (m, 30H, Pro-H_β, Pro-H_γ, Hyp-H_β, Ac), 2.16-2.47 (m, 13H, Hyp-H_β, Pro-H_β), 3.40-3.68 (m, 14H, Pro-H_δ), 3.70-3.94 (m, 21H, Gly-H_α, Hyp-H_δ, Dyp-H_δ), 4.14-4.22 (m, 10H, Gly-H_α, Dyp-H_α, Dyp-H_β, Dyp-H_γ), 4.51-4.86 (m, 18H, Hyp-H_α, Hyp-H_γ, Pro-H_α), 7.83-8.40 (m, 7H, Gly-NH).

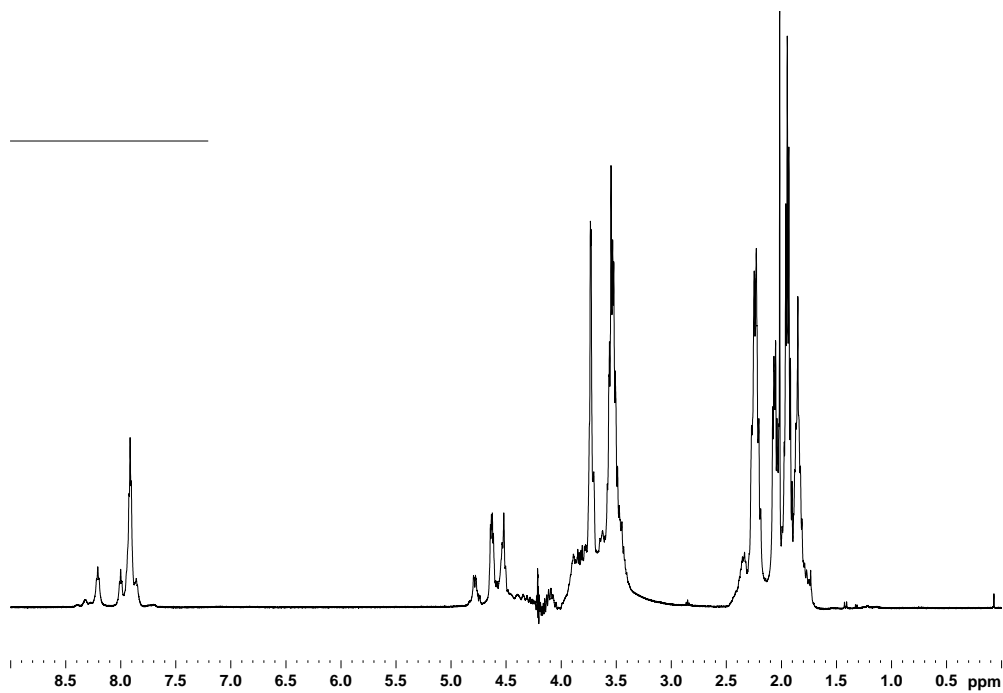
HRMS (ESI(+)): ber. für C₈₆H₁₂₄N₂₂O₃₀Na₂ [M+2Na]²⁺: 995.9334; gef.: 995.9328.

HPLC: *t_R* = 13,7 min (Gradient: 2 → 20% B in 20 min bei 60 °C).

Experimenteller Teil



^1H -NMR: 600 MHz, 300 K, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1 (Tripelhelix)



^1H -NMR: 500 MHz, 350 K, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1 (Einzelstrang)

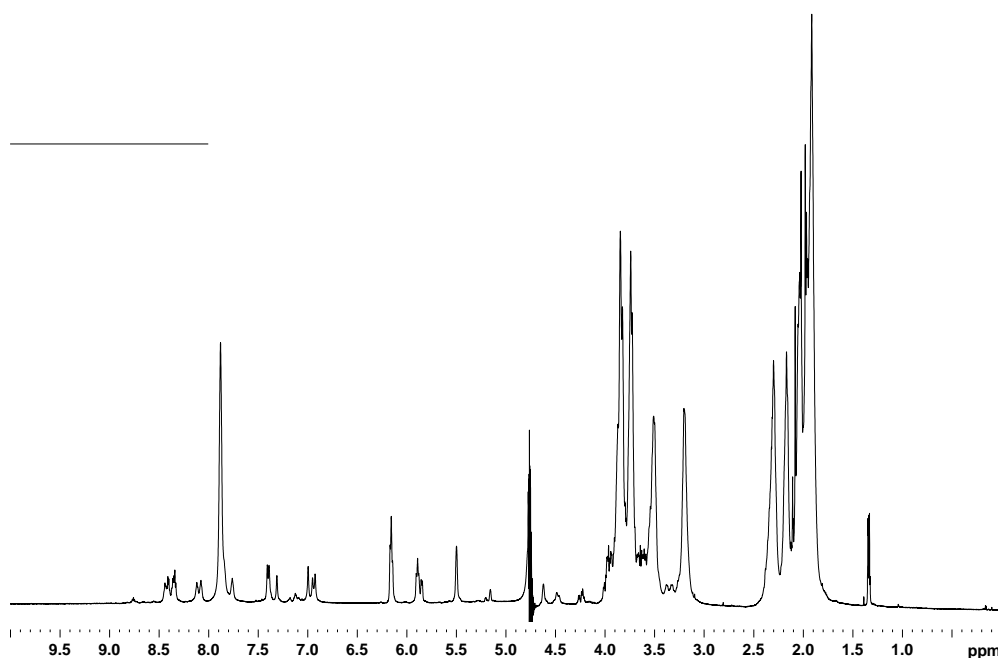
Ac-(Pro-Hyp-Gly)₆-Pro-Dhp-Gly-NH₂ (30)

Ac-(Pro-Hyp-Gly)₆-Pro-Dhp-Gly-NH₂ (30) wurde nach der *allgemeinen Vorschrift 1* in einer Ansatzgröße von 0,05 mm auf Rink-Amid-Harz (B = 0,35 mmol/g, 100-200 mesh) synthetisiert. Nach einer N-terminalen Acetylierung mit 30,0 Äq. DIPEA und 30,0 Äq. Ac₂O erfolgte die Abspaltung vom Harz nach der *allgemeinen Vorschrift 4*. Nach Reinigung mittels semipräparativer RP-HPLC (2 → 20 B in 60 min bei 50 °C) wurde **30** (27,4 mg, 29%) als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR: 600 MHz, 300 K, H₂O/D₂O 9:1 (Tripelhelix): δ [ppm] = 1.80-2.11 (m, 90H, Pro-H_β, Pro-H_γ, Hyp-H_β, Ac), 2.13-2.38 (m, 39H, Hyp-H_β, Pro-H_β) 3.00-3.30 (m, 21H, Pro-H_δ), 3.43-3.63 (m, 21H, Pro-H_δ), 3.68-3.92 (m, 78H, Gly-H_α, Hyp-H_δ), 4.43-4.50 (m, 3H, Dhp-H_δ), 4.50-4.80 (m, 60H, Hyp-H_γ, Pro-H_α, Hyp-H_α, Dhp-H_δ), 5.45-5.55 (m, 3H, Dhp-H_α), 5.82-5.94 (m, 3H, Dhp-H_γ), 6.10-6.20 (m, 3H, Dhp-H_β) 6.93 (s, 1H, NH₂), 6.95 (s, 1H, NH₂), 6.99 (s, 1H, NH₂), 7.27-7.43 (m, 3H, NH₂), 7.68-8.50 (m, 21H, Gly-NH).

HRMS (ESI(+)): ber. für C₈₆H₁₂₂N₂₂O₂₈Na₂ [M+2Na]²⁺: 978.9306; gef.: 978.9314.

HPLC: t_R = 14,5 min (Gradient: 2→ 20% B in 20 min bei 60 °C).



¹H-NMR: 600 MHz, 300 K, H₂O/D₂O 9:1 (Tripelhelix)

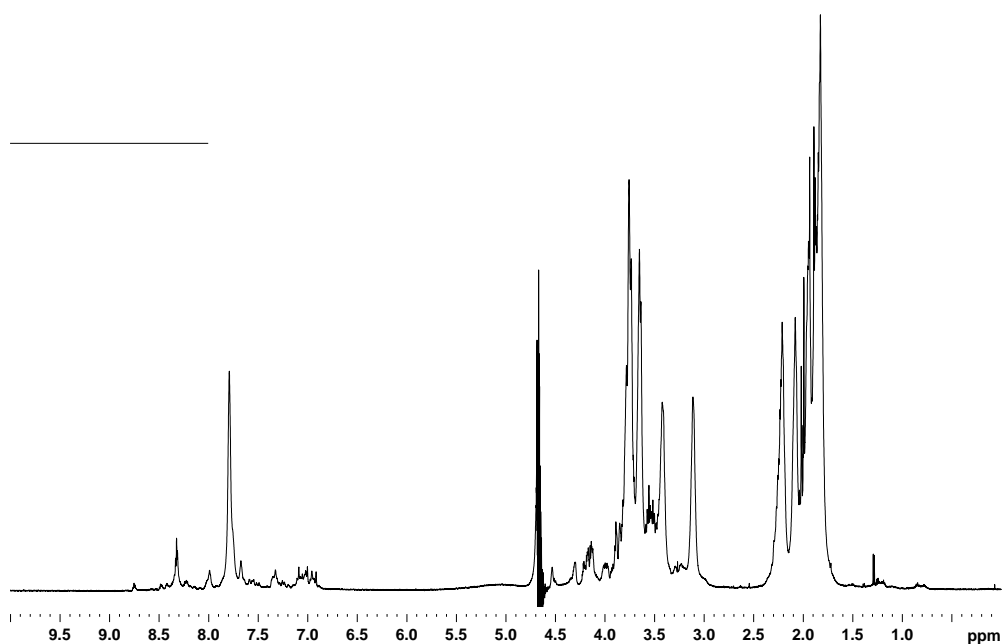
Ac-(Pro-Hyp-Gly)₆-Pro-Dyp-Gly-NH₂ (31)

1,00 mg **30** (523 nmol, 1,00 Äq.) wurden zusammen mit 39,0 µg K₂OsO₄•2H₂O (105 nmol, 0,20 Äq.), 81,0 µg NMO (696 nmol, 1,33 eq) und 82,0 mg Citronensäure•H₂O (392 nmol, 0,75 Äq.) wurden in H₂O (500 µL) gelöst. Nach 3 d bei Raumtemperatur wurde die Reaktionslösung mittels semipräparativer RP-HPLC (Gradient: 2 → 30% B in 60 min bei 50 °C) gereinigt. **31** (800 µg, 80%) wurde als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR: 600 MHz, 300 K, H₂O/D₂O 9:1 (Tripelhelix): δ [ppm] = 1.76-2.04 (m, 90H, Pro-H_γ, Pro-H_β, Hyp-H_β, Ac), 2.05-2.31 (m, 39H, Hyp-H_β, Pro-H_β) 3.00-3.30 (m, 21H, Pro-H_δ), 3.38-3.59 (m, 21H, Pro-H_δ), 3.60-3.92 (m, 84H, Gly-H_α, Hyp-H_δ, Dyp-H_δ), 4.10-4.37 (m, 9H, Dyp-H_α, Dyp-H_β, Dyp-H_δ), 4.49-4.77 (m, 57H, Hyp-H_α, Pro-H_α, Hyp-H_γ), 6.83-7.40 (m, 6H, NH₂), 7.61-8.33 (m, 21H, Gly-NH).

HRMS (ESI(+)): ber. für C₈₆H₁₂₄N₂₂O₃₀Na₂ [M+2Na]²⁺: 995.9334; gef.: 995.9341.

HPLC: *t_R* = 13,9 min (Gradient: 2 → 20% B in 20 min bei 60 °C).



¹H-NMR: 600 MHz, 300 K, H₂O/D₂O 9:1 (Tripelhelix)

Ac-(Pro-Hyp-Gly)₃-Pro-Pro-Gly-(Pro-Hyp-Gly)₃-NH₂ (32)

Ac-(Pro-Hyp-Gly)₃-Pro-Pro-Gly-(Pro-Hyp-Gly)₃-NH₂ (32) wurde nach der *allgemeinen Vorschrift 1* in einer Ansatzgröße von 0,05 mm auf Rink-Amid-Harz (B = 0,35 mmol/g, 100-200 mesh) synthetisiert. Nach einer N-terminalen Acetylierung mit 30,0 Äq. DIPEA und 30,0 Äq. Ac₂O erfolgte die Abspaltung vom Harz nach der *allgemeinen Vorschrift 4*. Nach Reinigung mittels semipräparativer RP-HPLC (2 → 20 B in 60 min bei 50 °C) wurde **32** (24,9 mg, 26%) als farbloser Feststoff erhalten.

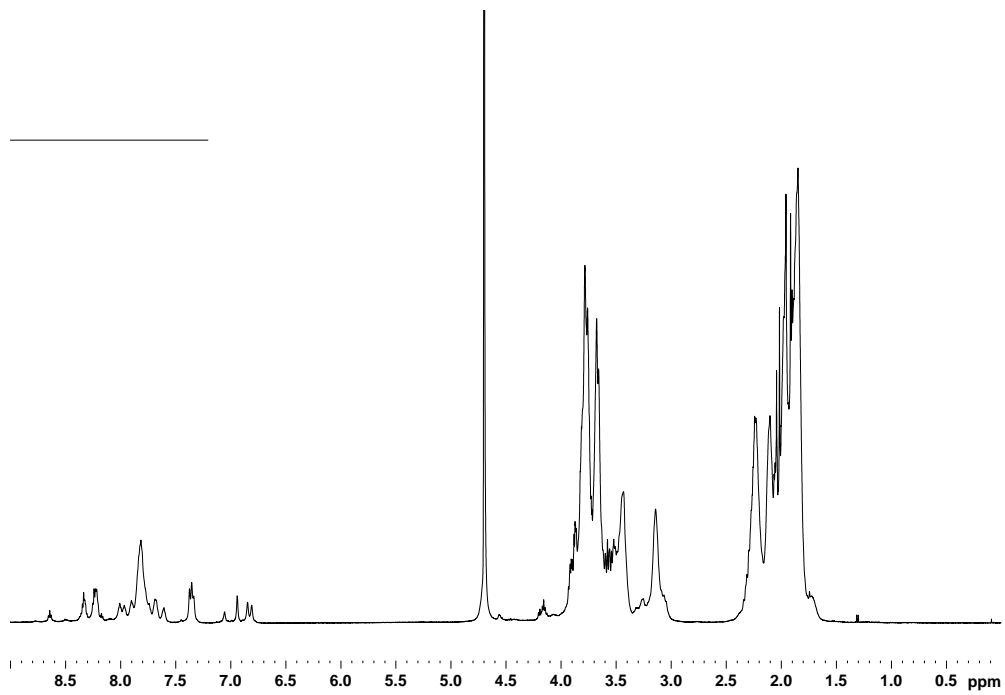
¹H-NMR: 600 MHz, 300 K, H₂O/D₂O 9:1 (Tripelhelix): δ [ppm] = 1.77-1.93 (m, 75H, Pro-H_γ, Pro-H_β, Ac), 1.94-2.05 (m, 27H, Hyp-H_β, Ac), 2.07-2.15 (m, 18H, Hyp-H_β), 2.18-2.30 (m, 24H, Pro-H_β), 3.00-3.30 (m, 21H, Pro-H_δ), 3.38-3.50 (m, 27H, Pro-H_δ), 3.63-3.72 (m, 39H, Gly-H_α, Hyp-H_δ), 3.73-3.85 (m, 39H, Gly-H_α, Hyp-H_δ), 4.51-4.60 (m, 18H, Hyp-H_γ), 4.69-4.72 (m, 42H, Pro-H_α, Hyp-H_α), 6.81 (s, 1H, NH₂), 6.85 (s, 1H, NH₂), 6.94 (s, 1H, NH₂), 7.27-7.40 (m, 3H, NH₂), 7.56-8.40 (m, 21H, Gly-NH).

¹H-NMR: 500 MHz, 350 K, H₂O/D₂O 9:1 (Einzelstrang): δ [ppm] = 1.66-2.02 (m, 24H, Pro-H_β, Pro-H_γ), 2.03-2.15 (m, 9H, Hyp-H_β, Ac), 2.15-2.44 (m, 14H, Hyp-H_β, Pro-H_β), 3.38-3.69 (m, 18H, Pro-H_δ), 3.70-3.95 (m, 19H, Gly-H_α, Hyp-H_δ), 4.14-4.22 (m, 7H, Gly-H_α), 4.49-4.88 (m, 21H, Hyp-H_α, Hyp-H_γ, Pro-H_α), 7.66-8.42 (m, 7H, Gly-NH).

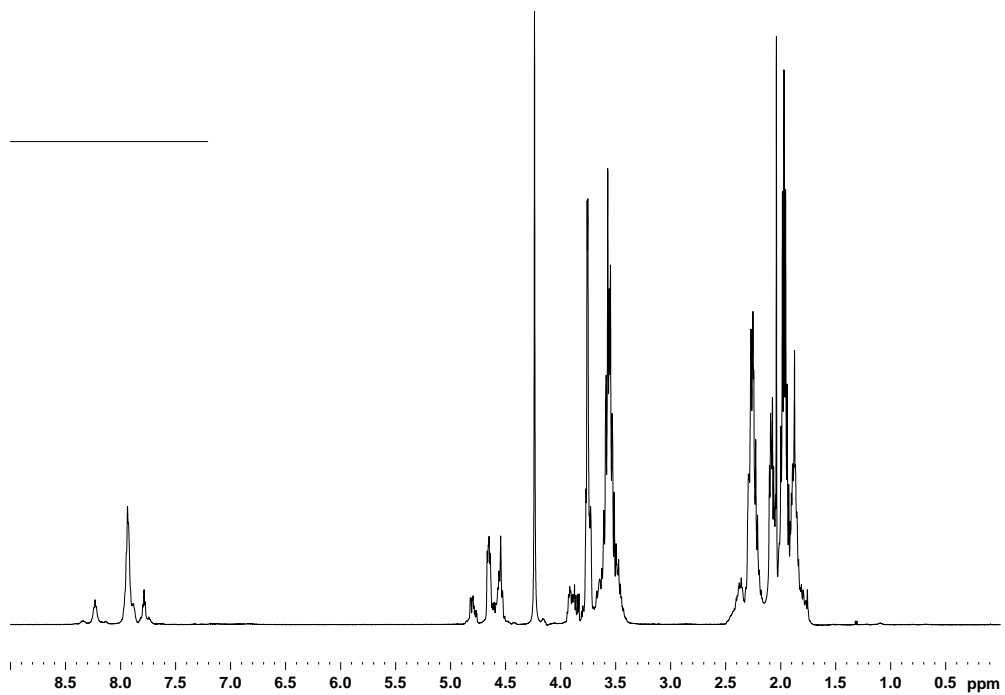
HRMS (ESI(+)): ber. für C₈₆H₁₂₄N₂₂O₂₀Na₂ [M+2Na]²⁺: 979.4370; gef.: 979.4375.

HPLC: t_R = 14,8 min (Gradient: 2 → 20% B in 20 min bei 60 °C).

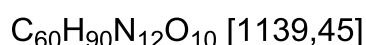
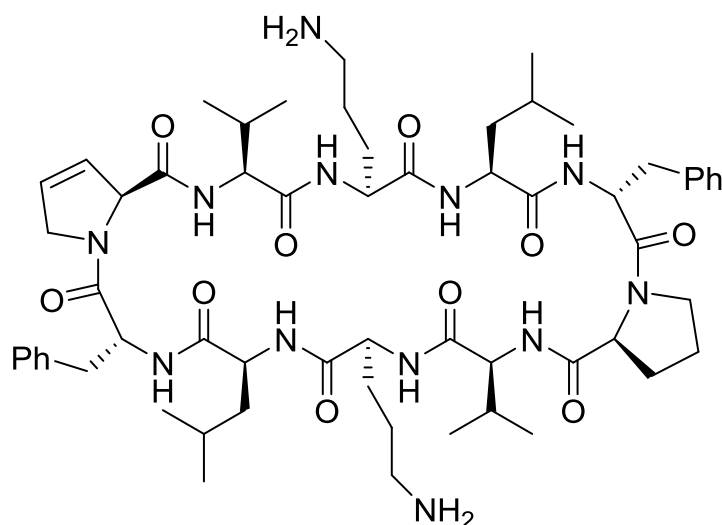
Experimenteller Teil



^1H -NMR: 500 MHz, 300 K, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1 (Tripelhelix)



^1H -NMR: 500 MHz, 350 K, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1 (Einzelstrang)

Zyk[Dhp-Val-Orn-Leu-D-Phe-Pro-Val-Orn-Leu-D-Phe] (33)

Das lineare Vorläuferpeptid wurde mittels automatisierter Festphasenpeptidsynthese an 2-CTC-Harz in einer Ansatzgröße von 0,1 mm dargestellt. Eine Abspaltung vom Harz erfolgte nach der *allgemeinen Vorschrift 5*. Die Zyklisierung in Lösung wurde nach der *allgemeinen Vorschrift 6* durchgeführt. Der Rückstand wurden bei 0 °C in DCM (5 mL)

gelöst, mit TFA (5 mL) versetzt und 60 min bei dieser Temperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der bräunliche Rückstand mittels semipräparativer RP-HPLC gereinigt. **33** (19,0 mg) wurde als farbloser Feststoff erhalten.

Tabelle 18: Chemische Verschiebungen (δ (^1H)/ppm) der verschiedenen Aminosäureprotonen von **33**. Eine Zuordnung erfolgte durch TOCSY-, ROESY- und HSQC-Spektren (600 MHz, 300 K, MeOH- d_3). Eine Bestimmung der Temperaturabhängigkeit der NH-Protonen (ppb/K) erfolgte aus ^1H -NMR-Spektren von 280 K bis 320 K in 10 K-Schritten.

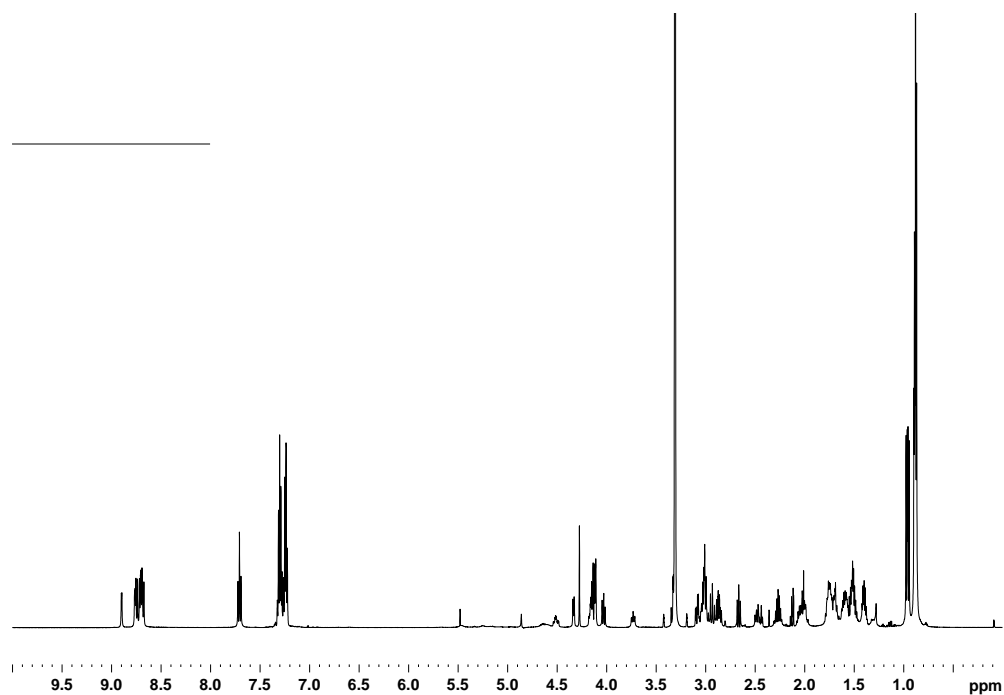
Aminos.	NH	H $_{\alpha}$	H $_{\beta}$	weitere	T. Grad.
Dhp ¹		4.92	5.76	H $_{\gamma}$ 5.76 H $_{\delta}^h$ 3.42 $^2J = 15.9$ Hz H $_{\delta}^t$ 4.43 $^2J = 15.9$ Hz $^3J = 4.4$ Hz	
Val ²	7.59 $^3J = 9.0$ Hz	4.07 $^3J = 9.0$ Hz $^3J = 9.0$ Hz	2.23	H $_{\gamma}$ 0.84	-3.22
Orn ³	8.66 $^3J = 9.1$ Hz	4.96	1.61; 2.06	H $_{\gamma}$ 1.75 H $_{\delta}$ 2.86; 3.01	-7.46
Leu ⁴	8.72 $^3J = 9.5$ Hz	4.66	1.41; 1.54	H $_{\gamma}$ 1.52 H $_{\delta}$ 0.88/0.89	-3.08
D-Phe ^{5/10}	8.83 8.87	4.51 $^3J = 11.2$ Hz	2.96 $^2J = 12.9$ Hz	H $_{ar}$ 7.21-7.33	-9.10

Experimenteller Teil

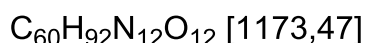
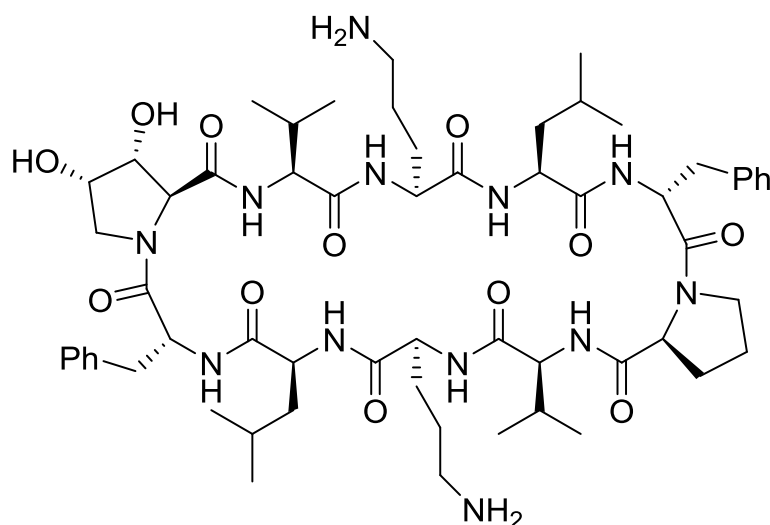
		$^3J = 5.3 \text{ Hz}$	$^3J = 11.1 \text{ Hz}$			-9.05
			3.09			
			$^2J = 12.9 \text{ Hz}$			
			$^3J = 5.3 \text{ Hz}$			
Pro ⁶	4.34		1.69; 2.00	H _γ	1.58; 1.70	
	$^3J = 1.7 \text{ Hz}$			H _δ ^h	2.48	
	$^3J = 8.0 \text{ Hz}$			H _δ ^t	3.73	
					$^2J = 10.7 \text{ Hz}$	
					$^3J = 8.2 \text{ Hz}$	
					$^3J = 2.5 \text{ Hz}$	
Val ⁷	7.69	4.17	2.26	H _γ	0.95	-3.16
	$^3J = 9.0 \text{ Hz}$	$^3J = 8.9 \text{ Hz}$				
		$^3J = 8.9 \text{ Hz}$				
Orn ⁸	8.67	4.96	1.61; 2.06	H _γ	1.75	-7.48
	$^3J = 9.1 \text{ Hz}$			H _δ	2.86; 3.01	
Leu ⁹	8.82	4.66	1.41; 1.54	H _γ	1.52	-3.32
	$^3J = 9.5 \text{ Hz}$			H _δ	0.88/0.89	

HRMS (ESI(+)): ber. für C₆₀H₉₀N₁₂O₁₀H [M+H]⁺: 1139.6976, gef.: 1139.6980.

HPLC: $t_R = 8,0 \text{ min}$ (Gradient: 10 → 90% B in 8 min).



¹H-NMR: 600 MHz, 300 K, MeOH-*d*₃

Zyk[Dyp-Val-Orn-Leu-D-Phe-Pro-Val-Orn-Leu-D-Phe] (34)

Das lineare Vorläuferpeptid wurde mittels automatisierter Festphasenpeptidesynthese an 2-CTC-Harz in einer Ansatzgröße von 0,1 mm dargestellt. Eine Abspaltung vom Harz erfolgte nach der *allgemeinen Vorschrift 5*. Die Zyklisierung in Lösung wurde nach der *allgemeinen Vorschrift 6* durchgeführt.

Der Rückstand wurde bei 0 °C in DCM (5 mL) gelöst, mit TFA (5 mL) versetzt und 60 min bei dieser Temperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der bräunliche Rückstand mittels semipräparativer RP-HPLC gereinigt. **34** (25,0 mg) wurde als farbloser Feststoff erhalten.

Tabelle 19: Chemische Verschiebungen (δ (^1H)/ppm) der verschiedenen Aminosäureprotonen von **34**. Eine Zuordnung erfolgte durch TOCSY-, ROESY- und HSQC-Spektren (600 MHz, 300 K, $\text{MeOH-}d_3$). Eine Bestimmung der Temperaturabhängigkeit der NH-Protonen (ppb/K) erfolgte aus ^1H -NMR-Spektren von 280 K bis 320 K in 10K-Schritten.

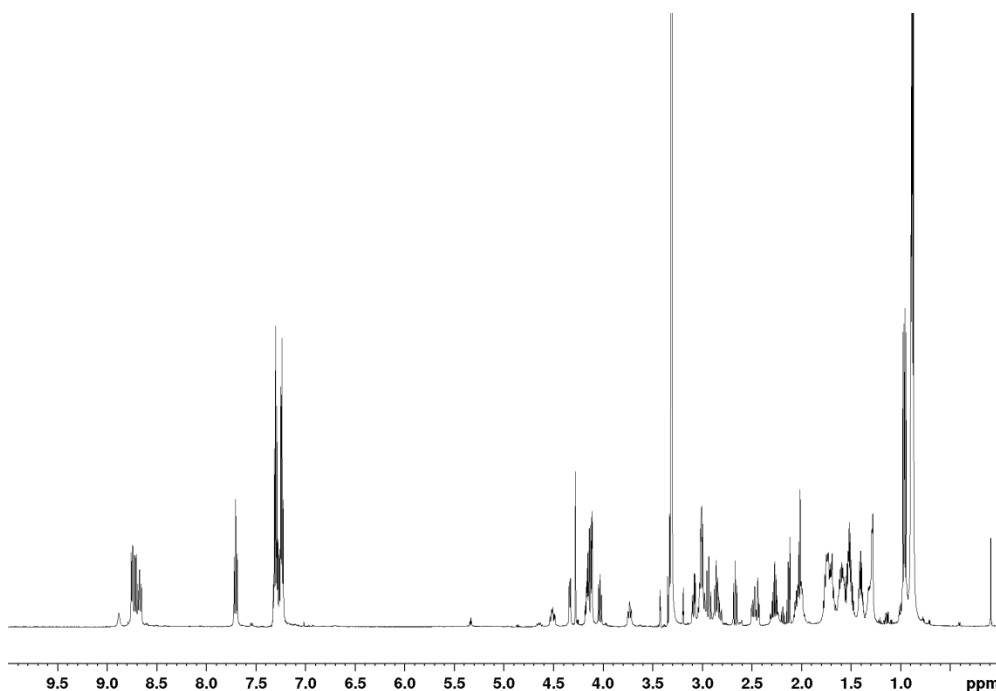
Aminos.	NH	H_α	H_β	weitere	T. Grad.
Dyp ¹		4.28 $^3J = 0.8 \text{ Hz}$	4.11 $^3J = 4.0 \text{ Hz}$ $^3J = 0.8 \text{ Hz}$	H_γ 4.17 $^3J = 4.0 \text{ Hz}$ $^3J = 8.0 \text{ Hz}$ $^3J = 8.0 \text{ Hz}$ $\text{H}_\delta^{\text{h}}$ 2.67 $^2J = 10.0 \text{ Hz}$ $^3J = 8.3 \text{ Hz}$ $\text{H}_\delta^{\text{t}}$ 4.03 $^2J = 10.1 \text{ Hz}$ $^3J = 7.9 \text{ Hz}$	
Val ²	7.71 $^3J = 9.2 \text{ Hz}$	4.14	2.27	H_γ 0.88/0.97	-3.19
Orn ³	8.68 $^3J = 9.4 \text{ Hz}$	4.97	1.60; 2.04	H_γ 1.76 H_δ 2.87; 3.03	-7.53
Leu ⁴	8.71	4.65	1.40; 1.54	H_γ 1.53	-3.17

Experimenteller Teil

	$^3J = 9.5 \text{ Hz}$			H_δ	0.88	
D-Phe ⁵	8.89	4.50	2.94	H_{ar}	7.20-7.34	-8.90
	$^3J = 3.5 \text{ Hz}$		$^2J = 12.7 \text{ Hz}$			
			$^3J = 11.7 \text{ Hz}$			
			3.09			
			$^2J = 12.7 \text{ Hz}$			
			$^3J = 5.0 \text{ Hz}$			
Pro ⁶		4.34	1.70; 2.00	H_γ	1.58; 1.70	
		$^3J = 1.7 \text{ Hz}$		H_δ^h	2.48	
		$^3J = 8.0 \text{ Hz}$			$^2J = 10.5 \text{ Hz}$	
					$^3J = 10.5 \text{ Hz}$	
					$^3J = 7.7 \text{ Hz}$	
				H_δ^t	3.73	
					$^2J = 10.7 \text{ Hz}$	
					$^3J = 8.2 \text{ Hz}$	
					$^3J = 2.5 \text{ Hz}$	
Val ⁷	7.70	4.14	2.27	H_γ	0.88/0.95	-3.11
	$^3J = 9.2 \text{ Hz}$					
Orn ⁸	8.70	4.97	1.60; 2.04	H_γ	1.76	-7.57
	$^3J = 9.5 \text{ Hz}$			H_δ	2.87; 3.03	
Leu ⁹	8.75	4.65	1.40; 1.54	H_γ	1.40; 1.53	-3.52
	$^3J = 9.5 \text{ Hz}$			H_δ	0.88	
D-Phe ¹⁰	8.76	4.52	3.01	H_{Ar}	7.20-7.34	-8.90
	$^3J = 3.7 \text{ Hz}$					

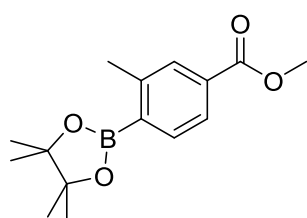
HRMS (ESI(+)): ber. für $C_{60}H_{92}N_{12}O_{12}H_2 [M+2H]^{2+}$: 587.8567, gef.: 587.8568.

HPLC: $t_R = 7,5 \text{ min}$ (Gradient: 10 → 90% B in 8 min).



^1H -NMR: 600 MHz, 300 K, $\text{MeOH-}d_3$

3-Methyl-4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)benzoic acid methyl ester^[303]



$\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{BO}_4$ [276,14]

7,50 g

4-Brom-3-methylbenzoic acid methyl ester

(32,7 mmol, 1,00 Äq.) wurden in entgastem DMSO (50 mL) gelöst und 9,65 g KOAc (98,2 mmol, 3,00 Äq.), 9,15 g $[\text{B}(\text{pin})_2]_2$ (36,0 mmol, 1,10 Äq.) und 535 mg $[\text{PdCl}_2(\text{dppf})] \cdot \text{DCM}$ (655 μmol , 2 mol%) zugegeben. Nach

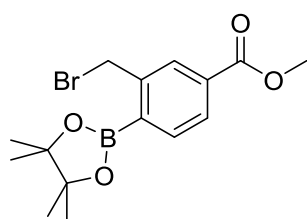
18 h bei 80 °C wurde das Lösungsmittel abkondensiert und der Rückstand mit H_2O (500 mL). Die wässrige Phase wurde mit DCM (3 x 300 mL) extrahiert. Das Lösungsmittel der vereinigten organischen Phasen wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Kieselgel gereinigt (DCM). **3-Methyl-4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)benzoic acid methyl ester** (9,02 g, 99%) wurde als braunes, viskoses Öl erhalten.

DC: $R_f = 0,70$ (DCM/MeOH 40:1).

¹H-NMR: 300 MHz, 300 K, DMSO-*d*₆: δ [ppm] = 1.31 (s, 12H, pin-CH₃), 2.51 (s, 3H, 3-CH₃), 3.85 (s, 3H, OMe), 7.71-7.78 (m, 3H, H_{ar}).

HRMS (ESI(+)): ber. für C₁₅H₂₁BO₄Na [M+Na]⁺: 299.1428, gef.: 299.1427.

3-(Brommethyl)-4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)benzoesäuremethylester^[157]

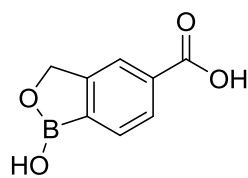


C₁₅H₂₀BBro₄ [355,04]

3,00 g **3-Methyl-4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)benzoesäuremethylester** (10,9 mmol, 1,00 Äq.) wurden in MeCN (70 mL) gelöst. Dann wurden 388 mg NBS (2,18 mmol, 0,20 Äq.) und 17,8 mg AIBN (109 μ mol, 1 mol%) zugegeben. Die Lösung wurde auf 70 °C erhitzt und 1,55 g NBS (8,72 mmol, 0,80 Äq.) in MeCN (15 mL) über 1 h zugetropft. Nach Zugabe wurde weitere 6 h auf 70 °C erhitzt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch über Kieselgel gereinigt (DCM). **3-(Brommethyl)-4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)benzoesäuremethylester** (3,50 g, 90%) wurde als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR: 300 MHz, 300 K, DMSO-*d*₆: δ [ppm] = 1.31 (s, 12H, pin-CH₃), 3.85 (s, 3H, OMe), 5.01 (s, 2H, CH₂Br), 7.82 (d, ³J = 7.8 Hz, 1H, 5-H), 7.89 (dd, ³J = 7.8, ⁴J = 1.6 Hz, 1H, 6-H), 8.04 (d, ⁴J = 1.3 Hz, 1H, 2-H).

1-Hydroxy-1,3-dihydrobenzo[c][1,2]oxaborol-5-carbonsäure (36)^[157]



C₈H₇BO₄ [177,95]

3,50 g **3-(Brommethyl)-4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)benzoesäuremethylester** (9,86 mmol, 1,00 Äq.) wurden in H₂O/Aceton (1:1, 120 mL) gelöst. 3,80 g NH₄OAc (49,3 mmol, 5,00 Äq.) und 10,5 g NaIO₄ (49,3 mmol, 5,00 Äq.) wurden zugegeben und die Reaktionslösung 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde unter vermindertem Druck eingeeengt und mit EtOAc (3 x 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in 15%iger KOH_{aq} (100 mL) gelöst und für 1,5 h bei Raumtemperatur gerührt. 5 M HCl_{aq} wurde bis zur Niederschlagsbildung zugegeben.

Der Niederschlag wurde abfiltriert, mit H₂O gewaschen und *in vacuo* getrocknet. **1-Hydroxy-1,3-dihydrobenzo[c][1,2]oxaborol-5-carbonsäure (36)**, 1,41 g, 80% über zwei Stufen) wurde als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR: 300 MHz, 300 K, DMSO-*d*₆: δ [ppm] = 5.04 (s, 2H, CH₂), 7.82 (d, ³*J* = 7.5 Hz, 1H, 5-H), 7.91 (dd, ³*J* = 7.7, ⁴*J* = 1.3 Hz, 1H, 6-H), 7.96 (d, ⁴*J* = 1.3 Hz, 1H, 2-H), 9.36 (s, 1H, BOH), 13.02 (s, 1H, COOH).

Borox-Gly-(Pro-Hyp-Gly)₇-NH₂ (37)

Borox-Gly-(Pro-Hyp-Gly)₇-NH₂ (37) wurde nach der *allgemeinen Vorschrift 1* in einer Ansatzgröße von 0,05 mm auf Rink-Amid-Harz (B = 0,35 mmol/g, 100-200 mesh) synthetisiert. Die Abspaltung vom Harz erfolgte nach der *allgemeinen Vorschrift 4*. Nach Reinigung mittels semipräparativer RP-HPLC (2 → 20 B in 60 min bei 50 °C) wurde **Borox-Gly-(Pro-Hyp-Gly)₇-NH₂ (37)**, 32,1 mg, 31%) als farbloser Feststoff erhalten.

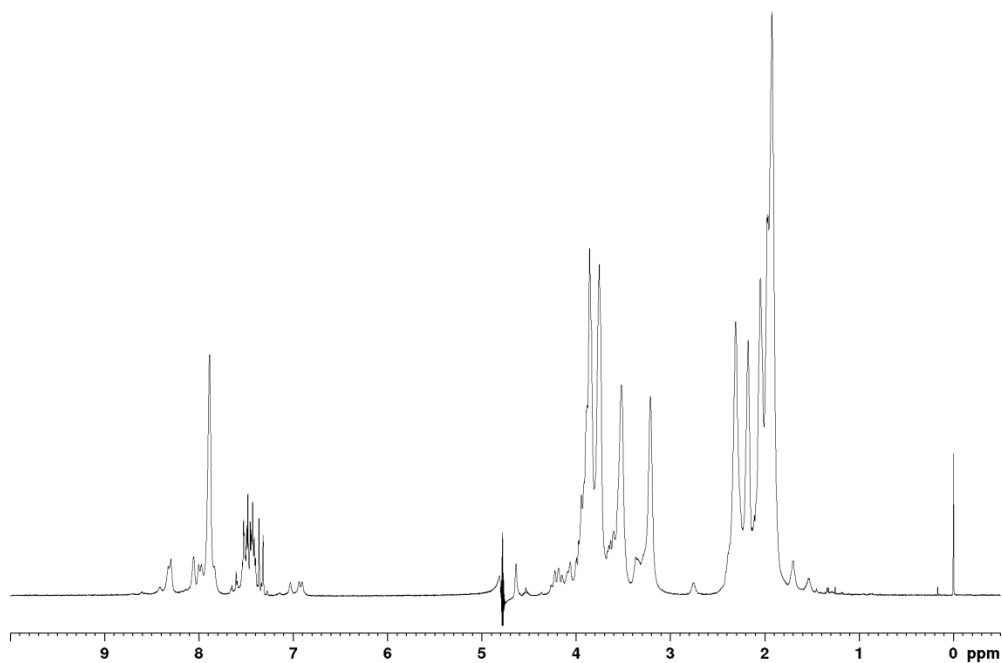
¹H-NMR: 600 MHz, 300 K, Phosphatpuffer/D₂O 9:1 (Tripelhelix): δ [ppm] = 1.50-1.58 (m, 1H, Pro-H_γ), 1.63-1.75 (m, 2H, Pro-H_β, Pro-H_γ), 1.83-2.10 (m, 81H, Pro-H_γ, Pro-H_β, Hyp-H_β), 2.15-2.45 (m, 42H, Pro-H_β, Hyp-H_β), 2.70-2.80 (m, 1H, Pro-H_δ), 3.14-3.40 (m, 21H, Pro-H_δ), 3.40-3.68 (m, 20H, Pro-H_δ), 3.68-3.80 (m, 42H, Gly-H_α, Hyp-H_δ), 3.80-4.00 (m, 42H, Gly-H_α, Hyp-H_δ), 4.00-4.28 (m, 6H, Gly-H_α), 4.60-4.67 (m, 21H, Hyp-H_γ), 4.73-4.82 (m, 48H, Pro-H_α, Hyp-H_α, Borox-CH₂), 6.91 (s, 1H, NH₂), 6.94 (s, 1H, NH₂), 7.03 (s, 1H, NH₂), 7.30-7.65 (m, 12H, H_{ar}, NH₂), 7.80-8.37 (m, 24H, Gly-NH).

¹H-NMR: 500 MHz, 350 K, Phosphatpuffer/D₂O 9:1 (Einzelstrang): δ [ppm] = 1.80-2.08 (m, 21H, Pro-H_β, Pro-H_γ), 2.09-2.22 (m, 10H, Hyp-H_β), 2.23-2.58 (m, 14H, Hyp-H_β, Pro-H_β), 3.44-3.68 (m, 14H, Pro-H_δ), 3.68-4.01 (m, 22H, Gly-H_α, Hyp-H_δ), 4.18-4.28 (m, 8H, Gly-H_α), 4.55-5.01 (m, 23H, Hyp-H_α, Hyp-H_γ, Pro-H_α, Borox-CH₂), 7.50-7.82 (m, 3H, H_{ar}).

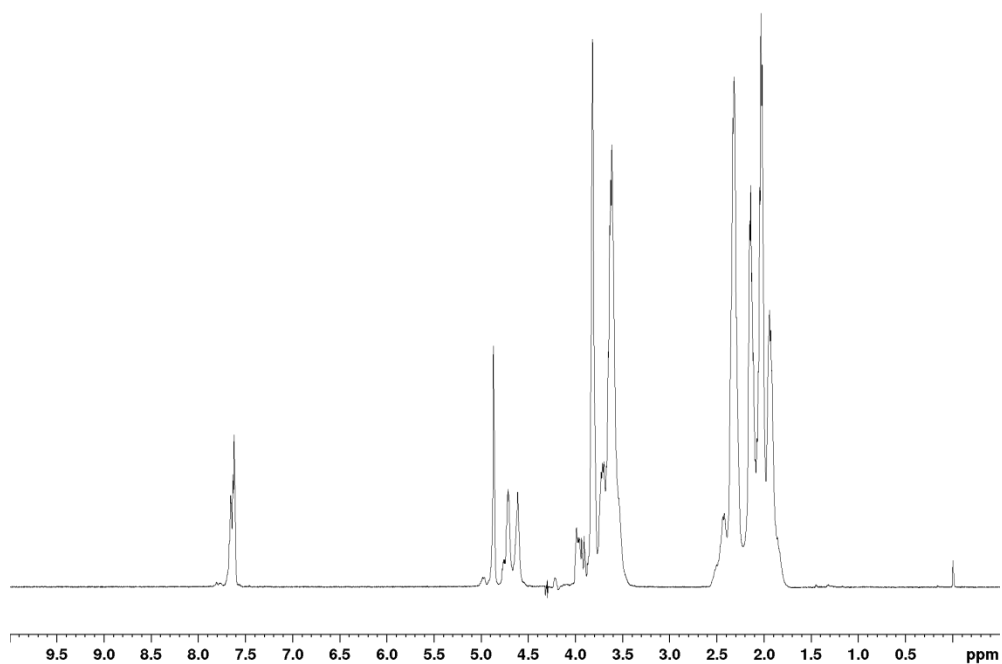
HRMS (ESI(+)): ber. für C₉₄H₁₃₀BN₂₃O₃₂H₂ [M+2H]²⁺: 1052.9753; gef.: 1052.9766.

HPLC: *t*_R = 16,9 min (Gradient: 2 → 20% B in 20 min bei 60 °C).

Experimenteller Teil

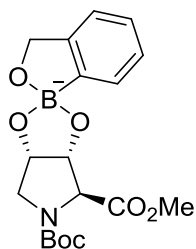


^1H -NMR: 600 MHz, 300 K, 50 mM pH = 7,4 Phosphatpuffer/ D_2O 9:1 (Tripelhelix).



^1H -NMR: 500 MHz, 300 K, 50 mM pH = 7,4 Phosphatpuffer/ D_2O 9:1 (Einzelstrang).

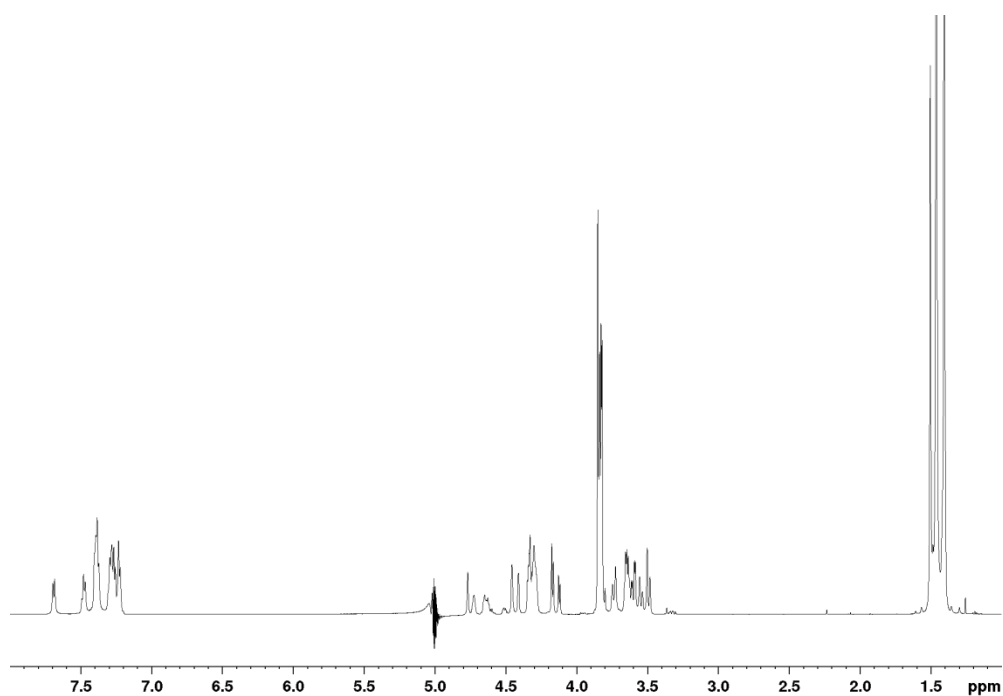
Boc-Dyp(Benzoboroxolester)-OMe (**38**)



Aus Stammlösungen von **25a** ($c = 73,0 \mu\text{M}$) und **35** ($c = 21,0 \mu\text{M}$) in Phosphatpuffer (50 mM, pH = 7,0) wurde eine NMR-Titration mit Verhältnissen (**25a:35**) von 0:1, 1:0, 1:1, 1:2, 1:4, 1:7 und 1:10 durchgeführt. In allen Fällen wurde ein Gemisch aus **25a**, **35** und **38** beobachtet.

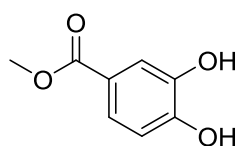
$\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{BNO}_7^-$ [376,19]

^1H -NMR: 600 MHz, 280 K, Phosphatpuffer/ D_2O 9:1 (nur **38** angegeben): δ [ppm] = 1.50 (s, 9H, CMe_3), 3.60-3.66 (m, 1H, H_δ), 3.71-3.76 (m, 1H, H_δ), 4.44-4.47 (m, 1H, H_α), 4.61-4.67 (m, 1H, H_β), 4.71-4.75 (m, 1H, H_γ), 5.00 (s, 2H, PhCH_2), 7.19-7.43 (m, 4H, H_{ar}).



^1H NMR: 600 MHz, 280 K, Phosphatpuffer/ D_2O 9:1 (**25a/35** 1:1)

3,4-Dihydroxybenzoesäuremethylester (39)^[353]



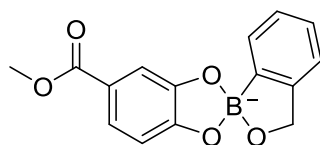
2,00 g **3,4-Dihydroxybenzoesäure** (13,0 mmol, 1,00 Äq.) wurden in MeOH (30 mL) gelöst und 1,64 mL SOCl₂ (14,3 mmol, 1,10 Äq.) bei 0 °C zugetropft. Nach 16 h bei Raumtemperatur wurde das C₈H₈O₄ [168,15] Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. **3,4-Dihydroxybenzoesäuremethylester (39)**, 2,15 g, 98%) wurde als grauer Feststoff erhalten.

DC: R_f = 0,82 (EtOAc).

¹H-NMR: 300 MHz, 300 K, DMSO-*d*₆ : δ [ppm] = 3.76 (s, 3H, OMe), 6.80 (d, ³J = 8.2 Hz, 1H, 5-H), 7.31 (dd, ³J = 8.2, ⁴J = 2.0 Hz, 1H, 6-H), 7.35 (d, ⁴J = 2.0 Hz, 1H, 2-H), 9.34 (s, 1H, OH), 9.77 (s, 1H, OH).

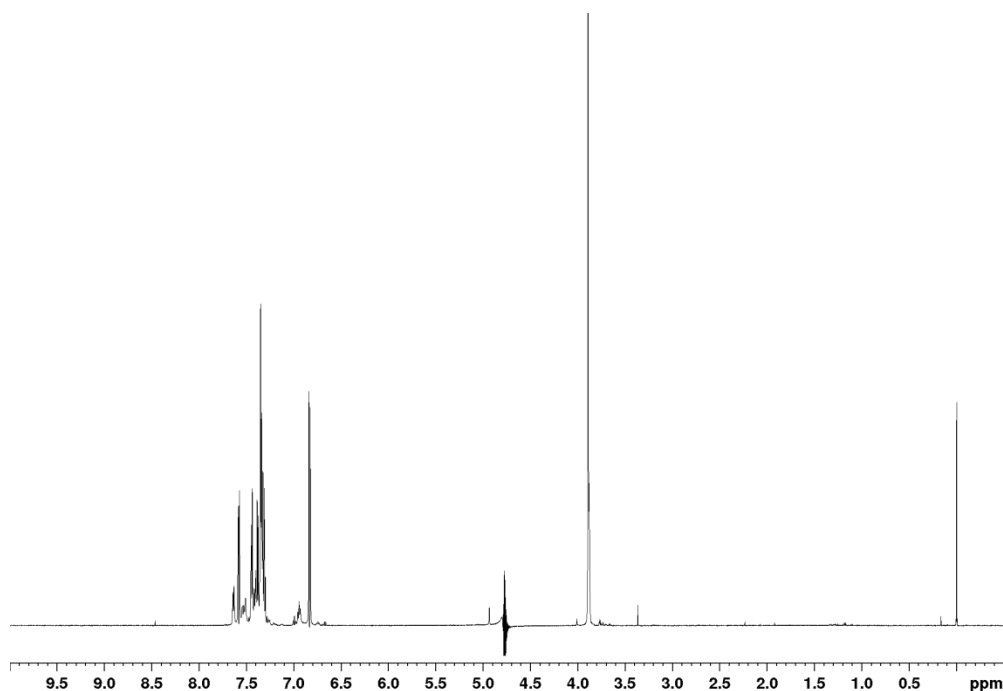
HPLC: t_R = 4,4 min (Gradient: 10 → 90% B in 8 min).

5'-(methoxycarbonyl)-3H-spiro[benzo[c][1,2]oxaborol-1,2'-benzo[d][1,3,2]dioxaborol]-1-uid (40)



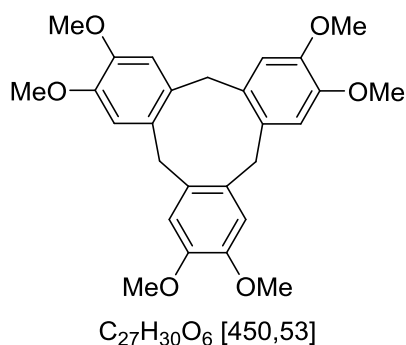
504 µg **3,4-Dihydroxybenzoesäuremethylester (39)** und 405 µg **Benzoboroxol (35)** wurden in 1,00 mL Phosphatpuffer (pH = 7,4, 50 mM, 10% D₂O) gelöst und in ein NMR-Röhrchen gegeben. In der 3 mM Lösung von **35** und **39** liegen diese im Gleichgewicht mit **40** vor.

¹H-NMR: 600 MHz, 300 K, Phosphatpuffer/D₂O 9:1 (nur **40** angegeben): δ [ppm] = 3.89 (s, 3H, OMe), 6.83 (d, ³J = 8.3 Hz, 1H, H_{ar}), 7.29-7.47 (m, 5H, H_{ar}), 7.58 (dd, ³J = 8.3, ⁴J = 2.0 Hz, 1H, H_{ar}).



$^1\text{H-NMR}$: 600 MHz, 300 K, Phosphatpuffer/ D_2O 9:1 (**35/40** 1:1)

Zykloveratrylen^[354]



5,00 g **Veratrol** (36,2 mmol, 1,00 Äq.) wurden in konz. HCl (40 mL) gelöst und mit 1,30 g Paraformaldehyd (43,3 mmol, 1,20 Äq.) versetzt. Dann wurde 5 h bei 60 °C und 14 h bei RT gerührt. Der entstandene Feststoff wurde abfiltriert, mit H_2O gewaschen und aus Toluol umkristallisiert. **Zykloveratrylen** (1,90 g, 34%) wurde als farbloser Feststoff erhalten. **DC**: $R_f = 0,58$

(EtOAc).

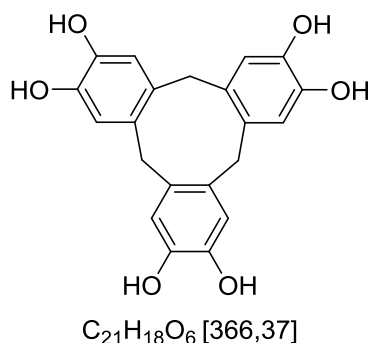
$^1\text{H-NMR}$: 300 MHz, 300 K, CDCl_3 : δ [ppm] = 3.35 (d, $^2J = 13.8$ Hz, 1H, H_{Eq}), 3.84 (s, 6H, OMe), 4.77 (d, $^2J = 13.8$ Hz, 1H, H_{Ax}), 6.83 (s, 2H, H_{ar}).

$^{13}\text{C-NMR}$: 75 MHz, 300 K, CDCl_3 : δ [ppm] = 36.7 (CH_2), 56.2 (OMe), 113.4 (C_{ar}), 132.0 (CCH), 147.9 (COMe).

HRMS (ESI(+)): ber. für $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_6\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 473.1935; gef.: 473.1930.

HPLC: $t_R = 9,7$ min (Gradient: 30 → 60% B in 20 min).

Zyklocatechylen (41)^[310]



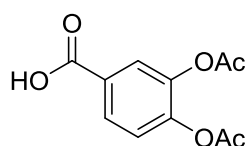
500 mg Zykloveratrylen (1,11 mmol, 1,00 Äq.) wurden in DCM (20 mL). 11,1 mL BBr_3 (1 M in DCM, 11,1 mmol, 10,0 Äq.) wurden bei 0 °C zugegeben. Nach 5 h bei Raumtemperatur wurde H_2O (50 mL) und EtOAc (50 mL) zugeben und mit EtOAc (2 x 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über $MgSO_4$ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter

vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels semipräparativer RP-HPLC (Gradient: 30 → 95% B in 45 min) gereinigt. **Zyklocatechylen (41)**, 250 mg, 61%) wurde als grauer Feststoff erhalten.

1H -NMR: 300 MHz, 300 K, $DMSO-d_6$: δ [ppm] = 3.21 (d, 2J = 13.6 Hz, 3H, H_{Eq}), 4.48 (d, 2J = 13.4 Hz, 3H, H_{Ax}), 6.65 (s, 6H, H_{ar}), 8.52 (s, 6H, OH).

HPLC: t_R = 5,2 min (Gradient: 10 → 90% B in 8 min).

3,4-Diacetoxybenzoesäure (42)^[355]

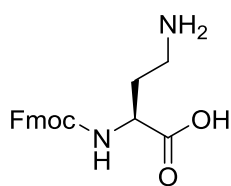


$C_{11}H_{10}O_6$ [238,20]

2,00 g 3,4-Dihydroxybenzoesäure (13,0 mmol, 1,00 Äq.) wurde in DCM (70 mL), 11,0 mL DIPEA (64,9 mmol, 5,00 Äq.) und 4,91 ml Ac_2O (51,9 mmol, 4,00 Äq.) suspendiert. Nach 1 h bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt säulenchromatographisch über Kieselgel gereinigt (DCM/MeOH 100:1 + 1% AcOH). **3,4-Diacetoxybenzoesäure (42)**, 2,55 g, 83%) wurde als farbloser Feststoff erhalten.

1H -NMR: 300 MHz, 300 K, $DMSO-d_6$: δ [ppm] = 2.29 (s, 3H, OAc), 2.31 (s, 3H, OAc), 7.41 (d, 3J = 8.4 Hz, 1H, 5-H), 7.80 (d, 4J = 2.0 Hz, 1H, 6-H), 7.87 (dd, 3J = 8.4, 4J = 2.0 Hz, 1H, 3-H), 13.2 (s_{br}, 1H, OH).

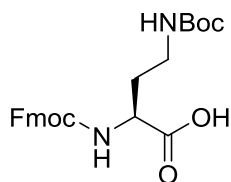
HRMS (ESI(+)): ber. für $C_{11}H_{10}O_6Na$ $[M+Na]^+$: 261.0381; gef.: 261.0370.

Fmoc-Dab-OH^[202]C₁₉H₂₀N₂O₄ [340,38]

890 mg Bis(Trifluoracetoxy)iodbenzol (2,08 mmol, 1,60 Äq.) wurden in DMSO/H₂O (9:1, 10 mL) gelöst und mit 480 mg **Fmoc-Gln-OH** (1,30 mmol, 1,00 Äq.) versetzt. Dann wurde die Reaktion auf 0 °C gekühlt und nach 15 min mit 420 µL Pyridin (5,20 mmol, 4,00 Äq.) versetzt. Nach 20 h bei Raumtemperatur wurde mit H₂O (25 mL) verdünnt und mit 5 M HCl auf pH = 3 gebracht. Dann wurde mit Et₂O (3 x 30 mL) gewaschen und die wässrige Phase mit 4 M NaOH_{aq} auf pH = 6 gebracht. Nach 1 h bei 0 °C wurde der Niederschlag abfiltriert und *in vacuo* getrocknet. **Fmoc-Dab-OH** (210 mg, 48%) wurde als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR: 300 MHz, 300 K, DMSO-*d*₆: δ [ppm] = 1.65-2.00 (m, 2H, H_β), 2.81-3.00 (m, 2H, H_γ), 3.58-3.68 (m, 1H, H_α), 4.17-4.31 (m, 3H, Fmoc CH₂-CH), 6.58-6.71 (m, 1H, NH), 7.33 (t, 2H, H_{ar}), 7.41 (t, 2H, H_{ar}), 7.68 (d, 2H, H_{ar}), 7.89 (d, 2H, H_{ar}).

HRMS (ESI(+)): ber. für C₁₉H₂₀N₂O₄H [M+H]⁺: 341.1496; gef.: 341.1495.

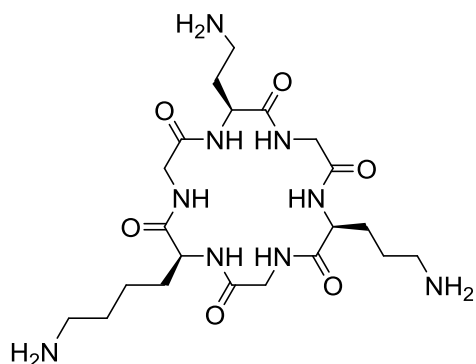
Fmoc-Dab(Boc)-OH^[202]C₂₄H₂₈N₂O₆ [440,50]

210 mg **Fmoc-Dab-OH** (620 µmol, 1,00 Äq.) wurden in 1,4-Dioxan/H₂O (1:1, 20 mL) gelöst und mit 520 µL DIPEA (1,54 mmol, 2,50 Äq.) und 200 mg Boc₂O (930 µmol, 1,50 Äq.) versetzt. Nach 16 h bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in EtOAc (30 mL) aufgenommen. Die organische Phase wurde mit 10% Citronensäure_{aq} (2 x 40 mL), H₂O (30 mL) und ges. NaCl_{aq} (30 mL) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. **Fmoc-Dab(Boc)-OH** (290 mg, quant.) wurde als farbloser Schaum erhalten.

¹H-NMR: 300 MHz, 300 K, DMSO-*d*₆: δ [ppm] = 1.37 (s, 9H, CMe₃), 1.60-1.95 (m, 2H, H_β), 2.90-3.08 (m, 2H, H_γ), 3.58-3.68 (m, 1H, H_α), 3.90-4.38 (m, 3H, Fmoc CH₂-CH), 6.74-6.93 (m, 1H, NH_α), 7.33 (t, ³J = 7.3 Hz, 2H, H_{ar}), 7.42 (t, ³J = 7.3 Hz, 2H, H_{ar}), 7.66 (d, ³J = 8.3 Hz, 2H, NH_δ), 7.73 (d, ³J = 7.2 Hz, 2H, H_{ar}), 7.90 (d, ³J = 7.4 Hz, 2H, H_{ar}), 12,57 (s, 1H, CO₂H).

HRMS (ESI(+)): ber. für $C_{24}H_{28}N_2O_6Na$ $[M+H]^+$: 463.1840; gef.: 463.1842.

Zyk(Dab-Gly-Lys-Gly-Orn-Gly) (43)



$C_{21}H_{39}N_9O_6$ [513,60]

Das lineare Vorläuferpeptid wurde mittels automatisierter Festphasenpeptidesynthese an 2-CTC-Harz in einer Ansatzgröße von 0,1 mm dargestellt. Eine Abspaltung vom Harz erfolgte nach der *allgemeinen Vorschrift 5*. Die Zyklisierung in Lösung wurde nach der *allgemeinen Vorschrift 6* durchgeführt. Der Rückstand mittels semipräparativer RP-HPLC

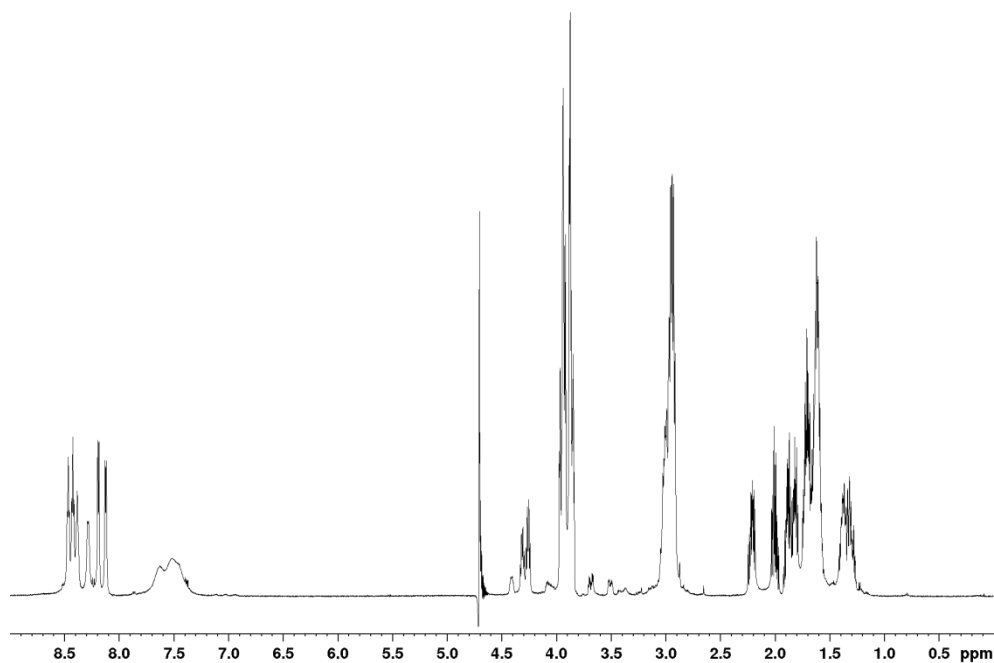
gereinigt (Gradient: 30% → 70% B in 45 min). Das seitenkettengeschützte Peptid wurde in DCM (4 mL) gelöst, mit TFA (1 mL) versetzt und 60 min bei dieser Temperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in H₂O aufgenommen und lyophilisiert. **Zyk(Dab-Gly-Lys-Gly-Orn-Gly) (43**, 6,70 mg) wurde als gelblicher Feststoff erhalten.

¹H-NMR: 600 MHz, 300 K, H₂O/D₂O 9:1; δ [ppm] = 1.31-1.50 (m, 2H, Lys³-H_γ), 1.61-1.83 (m, 6H, Lys³-H_δ, Orn⁵-H_γ, Lys³-H_β, Orn⁵-H_β), 1.84-2.00 (m, 2H, Lys³-H_β, Orn⁵-H_β), 2.02-2.12 (m, 1H, Dab¹-H_β), 2.22-2.34 (m, 1H, Dab¹-H_β), 2.93-3.13 (m, 6H, Lys³-H_ε, Orn⁵-H_δ, Dab¹-H_γ), 3.89-4.05 (m, 6H, Gly^{2,4,6}-H_α), 4.29-4.35 (m, 1H, Lys³-H_α), 4.35-4.41 (m, 1H, Orn⁵-H_α), 4.45-4.51 (m, 1H, Dab¹-H_α), 8.19 (d, ³J = 7.0 Hz, 1H, Orn⁵-NH), 8.26 (d, ³J = 7.0 Hz, 1H, Lys³-NH), 8.35 (d, ³J = 7.0 Hz, 1H, Dab¹-NH), 8.45 (d, ³J = 5.7 Hz, 1H, Gly²-NH), 8.49 (d, ³J = 5.7 Hz, 1H, Gly⁴-NH), 8.53 (d, ³J = 5.7 Hz, 1H, Gly⁶-NH).

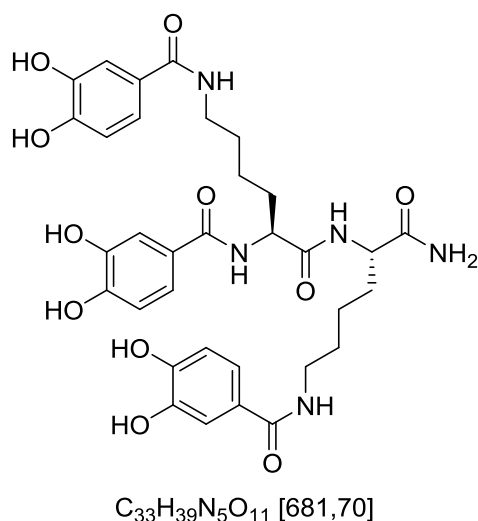
HRMS (ESI(+)): ber. für $C_{24}H_{28}N_2O_6Na$ $[M+H]^+$: 463.1840; gef.: 463.1842.

HPLC: t_R = 6,6 min (Seitenkettengeschützt, Gradient: 10 → 90% B in 8 min).

Experimenteller Teil



^1H -NMR: 600 MHz, 300 K, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1

Cat-Lys(Cat)-Lys(Cat)-NH₂ (44)

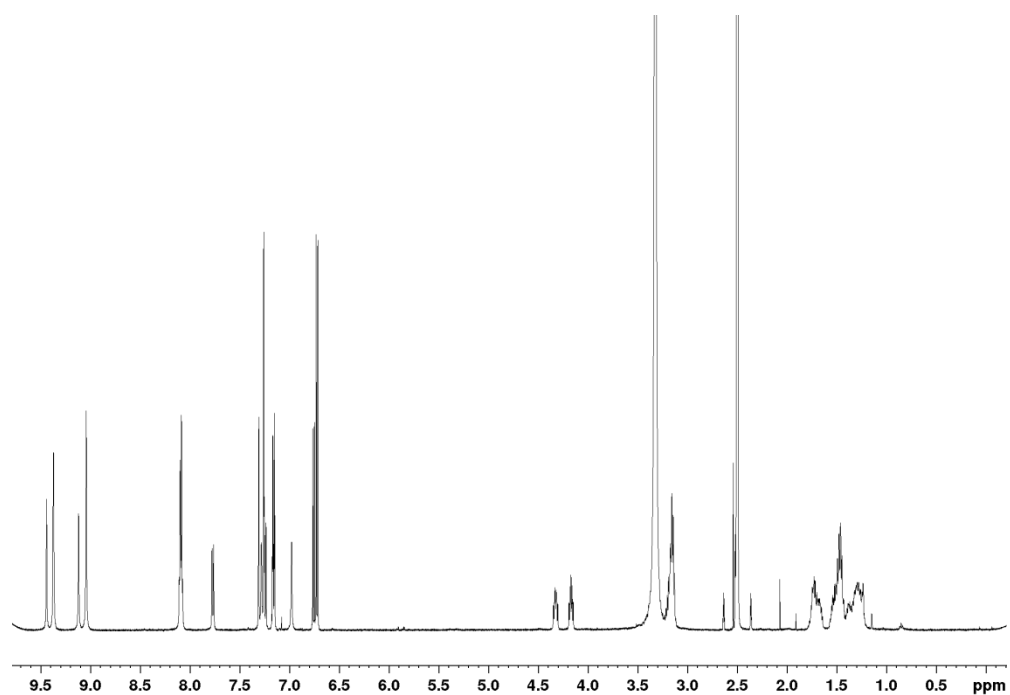
Cat-Lys(Cat)-Lys(Cat)-NH₂ (44) wurde nach der *allgemeinen Vorschrift 3* in einer Ansatzgröße von 0,10 mm auf LL-Rink-Amid-Harz (B = 0,35 mmol/g, 100-200 mesh) synthetisiert. Die Abspaltung vom Harz erfolgte nach der *allgemeinen Vorschrift 4*. Nach Reinigung mittels semipräparativer RP-HPLC (2 → 20 B in 60 min bei 50 °C) wurde **Cat-Lys(Cat)-Lys(Cat)-NH₂ (44)**, 6,10 mg, 10%) als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR: 500 MHz, 300 K, DMSO-*d*₆: δ [ppm] = 1.19-1.40 (m, 4H, Lys¹-H_γ, Lys²-H_γ), 1.41-1.58 (m, 5H, Lys¹-H_δ, Lys²-H_β, Lys²-H_δ), 1.63-1.80 (m, 3H, Lys¹-H_β, Lys²-H_β), 3.10-3.23 (m, 4H, Lys¹-H_ε, Lys²-H_ε), 4.17 (ddd, ³*J* = 8.2, ³*J* = 8.2, ³*J* = 5.2 Hz, 1H, Lys²-H_α), 4.32 (ddd, ³*J* = 8.3, ³*J* = 8.3, ³*J* = 5.2 Hz, 1H, Lys¹-H_α), 6.72 (d, ³*J* = 8.2 Hz, 2H, 5-H), 6.76 (d, ³*J* = 8.2 Hz, 1H, 5-H), 6.98 (s, 1H, NH₂), 7.15 (dd, ³*J* = 8.2, ⁴*J* = 2.0 Hz, 1H, 6-H), 7.16 (dd, ³*J* = 8.2, ⁴*J* = 2.2 Hz, 1H, 6-H), 7.24 (dd, ³*J* = 8.2, ⁴*J* = 2.1 Hz, 1H, 6-H), 7.26 (d, ⁴*J* = 2.1 Hz, 2H, 2-H), 7.28 (s, 1H, NH₂), 7.31 (d, ⁴*J* = 2.2 Hz, 1H, 2-H), 7.77 (d, ³*J* = 8.5 Hz, 1H, Lys²-NH_α), 8.05-8.13 (m, 3H, Lys²-NH_α, Lys²-NH_ε, Lys¹-NH_ε), 9.04 (s, 2H, 3-OH), 9.12 (s, 1H, 3-OH), 9.37 (s, 1H, 4-OH), 9.38 (s, 1H, 4-OH), 9.44 (s, 1H, 4-OH).

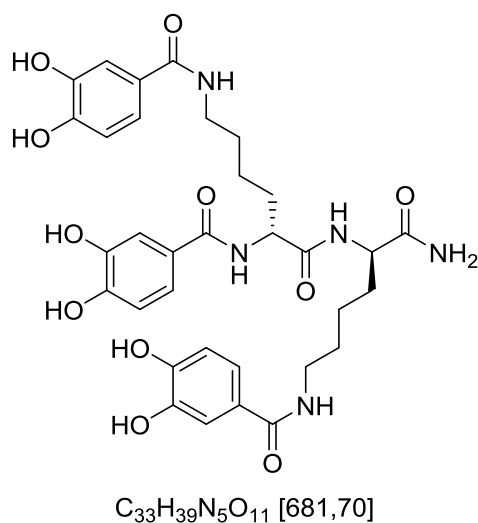
HRMS (ESI(+)): ber. für C₃₃H₃₉N₅O₁₁Na [M+Na]⁺: 704.2538; gef.: 704.2553.

HPLC: *t*_R = 4,1 min (Gradient: 10 → 90% B in 8 min).

Experimenteller Teil



^1H -NMR: 500 MHz, 300 K, $\text{DMSO-}d_6$

Cat-D-Lys(Cat)-D-Lys(Cat)-NH₂ (45)

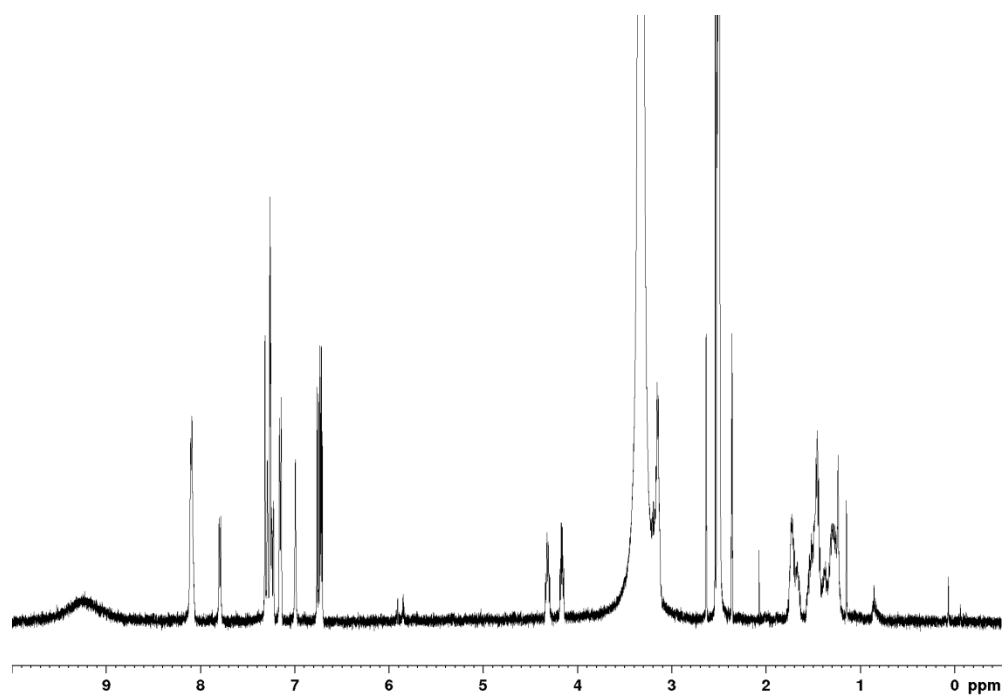
Cat-D-Lys(Cat)-D-Lys(Cat)-NH₂ (45) wurde nach der *allgemeinen Vorschrift 3* in einer Ansatzgröße von 0,10 mm auf LL-Rink-Amid-Harz ($B = 0,35$ mmol/g, 100-200 mesh) synthetisiert. Die Abspaltung vom Harz erfolgte nach der *allgemeinen Vorschrift 4*. Nach Reinigung mittels semipräparativer RP-HPLC (2 → 20 B in 60 min bei 50 °C) wurde **Cat-D-Lys(Cat)-D-Lys(Cat)-NH₂ (45)**, 6,60 mg, 11%) als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR: 500 MHz, 300 K, DMSO-*d*₆: δ [ppm] = 1.19-1.58 (m, 9H, D-Lys¹-H_γ, D-Lys²-H_γ, D-Lys¹-H_δ, D-Lys²-H_β, D-Lys²-H_δ), 1.63-1.80 (m, 3H, D-Lys¹-H_β, D-Lys²-H_β), 3.10-3.23 (m, 4H, D-Lys¹-H_ε, D-Lys²-H_ε), 4.17 (ddd, ³*J* = 8.2, ³*J* = 8.2, ³*J* = 5.2 Hz, 1H, Lys²-H_α), 4.32 (ddd, ³*J* = 8.3, ³*J* = 8.3, ³*J* = 5.2 Hz, 1H, Lys¹-H_α), 6.71 (d, ³*J* = 8.2 Hz, 1H, 5-H), 6.72 (d, ³*J* = 8.2 Hz, 1H, 5-H), 6.76 (d, ³*J* = 8.2 Hz, 1H, 5-H), 6.99 (s, 1H, NH₂), 7.15 (dd, ³*J* = 8.2, ⁴*J* = 2.0 Hz, 1H, 6-H), 7.16 (dd, ³*J* = 8.2, ⁴*J* = 2.2 Hz, 1H, 6-H), 7.25 (d, ³*J* = 8.2 Hz, 1H, 6-H), 7.26 (d, ⁴*J* = 2.1 Hz, 2H, 2-H), 7.28 (s, 1H, NH₂), 7.31 (d, ⁴*J* = 2.2 Hz, 1H, 2-H), 7.79 (d, ³*J* = 8.5 Hz, 1H, Lys²-NH_α), 8.05-8.13 (m, 3H, Lys²-NH_α, Lys²-NH_ε, Lys¹-NH_ε), 9.26 (s_{br}, 6H, OH).

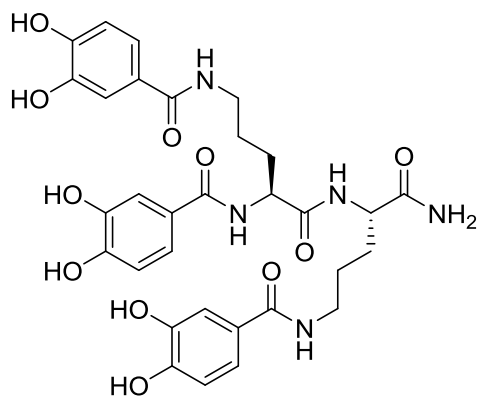
HRMS (ESI(+)): ber. für C₃₃H₃₉N₅O₁₁Na [M+Na]⁺: 704.2538; gef.: 704.2549.

HPLC: *t*_R = 4,1 min (Gradient: 10 → 90% B in 8 min).

Experimenteller Teil



^1H -NMR: 500 MHz, 300 K, $\text{DMSO-}d_6$

Cat-Orn(Cat)-Orn(Cat)-NH₂ (46)C₃₁H₃₅N₅O₁₁ [653,65]

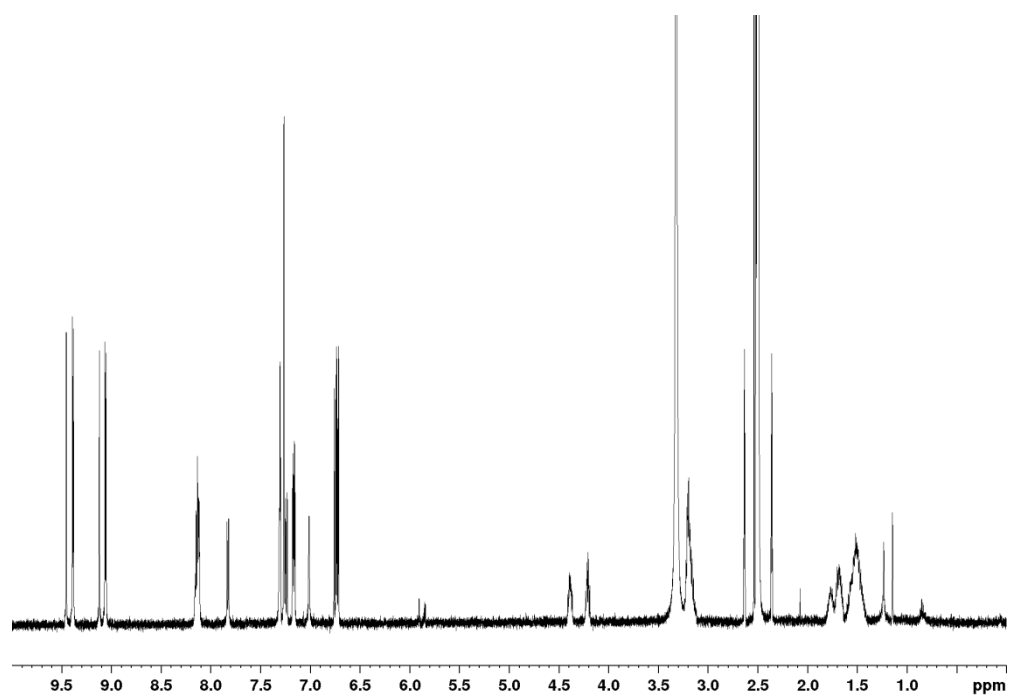
Cat-Orn(Cat)-Orn(Cat)-NH₂ (46) wurde nach der *allgemeinen Vorschrift 3* in einer Ansatzgröße von 0,10 mm auf LL-Rink-Amid-Harz (B = 0,35 mmol/g, 100-200 mesh) synthetisiert. Die Abspaltung vom Harz erfolgte nach der *allgemeinen Vorschrift 4*. Nach Reinigung mittels semipräparativer RP-HPLC (2 → 20 B in 60 min bei 50 °C) wurde **Cat-Orn(Cat)-Orn(Cat)-NH₂ (46)**, 3,30 mg, 5%) als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR: 500 MHz, 300 K, DMSO-*d*₆: δ [ppm] = 1.40-1.62 (m, 5H, Orn²-H_β, Orn^{1,2}-H_γ), 1.63-1.72 (m, 2H, Orn¹-H_β, Orn²-H_β), 1.73-1.82 (m, 1H, Orn¹-H_β), 3.11-3.27 (m, 4H, Orn^{1,2}-H_δ), 4.21 (ddd, ³*J* = 8.2, ³*J* = 8.2, ³*J* = 5.2 Hz, 1H, Orn²-H_α), 4.39 (ddd, ³*J* = 9.7, ³*J* = 8.0, ³*J* = 5.0 Hz, 1H, Orn²-H_α), 6.72 (d, ³*J* = 8.2 Hz, 1H, H-5), 6.73 (d, ³*J* = 8.2 Hz, 1H, H-5), 6.75 (d, ³*J* = 8.2 Hz, 1H, H-5), 7.01 (s, 1H, NH₂), 7.16 (dd, ³*J* = 8.4, ⁴*J* = 2.5 Hz, 1H, H-6), 7.17 (dd, ³*J* = 8.4, ²*J* = 2.5 Hz, 1H, H-6), 7.24 (dd, ³*J* = 8.3, ⁴*J* = 2.1 Hz, 1H, H-6), 7.26 (d, ⁴*J* = 2.1 Hz, 2H, H-2), 7.30 (d, ⁴*J* = 2.3 Hz, 1H, H-2), 7.32 (s, 1H, NH₂), 7.83 (d, ³*J* = 8.3 Hz, 1H, Orn²-NH_α), 8.13 (t, ³*J* = 5.7 Hz, 1H, Orn²-NH_δ), 8.14 (d, ³*J* = 8.0 Hz, 1H, Orn¹-NH_α), 8.15 (t, ³*J* = 6.0 Hz, 1H, Orn¹-NH_δ), 9.05 (s, 1H, 4-OH), 9.07 (s, 1H, 4-OH), 9.12 (s, 1H, 4-OH), 9.38 (s, 1H, 3-OH), 9.39 (s, 1H, 3-OH), 9.45 (s, 1H, 3-OH).

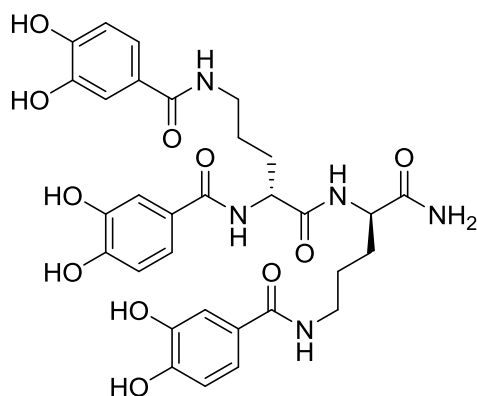
HRMS (ESI(+)): ber. für C₃₁H₃₅N₅O₁₁Na [M+Na]⁺: 676.2225; gef.: 676.2237.

HPLC: *t*_R = 3,8 min (Gradient: 10 → 90% B in 8 min).

Experimenteller Teil



^1H -NMR: 500 MHz, 300 K, $\text{DMSO-}d_6$

Cat-D-Orn(Cat)-D-Orn(Cat)-NH₂ (47)C₃₁H₃₅N₅O₁₁ [653,65]

Cat-D-Orn(Cat)-D-Orn(Cat)-NH₂ (47) wurde nach der *allgemeinen Vorschrift 3* in einer Ansatzgröße von 0,10 mm auf LL-Rink-Amid-Harz (B = 0,35 mmol/g, 100-200 mesh) synthetisiert. Die Abspaltung vom Harz erfolgte nach der *allgemeinen Vorschrift 4*. Nach Reinigung mittels semipräparativer RP-HPLC (2 → 20 B in 60 min bei 50 °C) wurde **Cat-D-Orn(Cat)-D-Orn(Cat)-NH₂ (47, 4,30 mg, 7%)** als

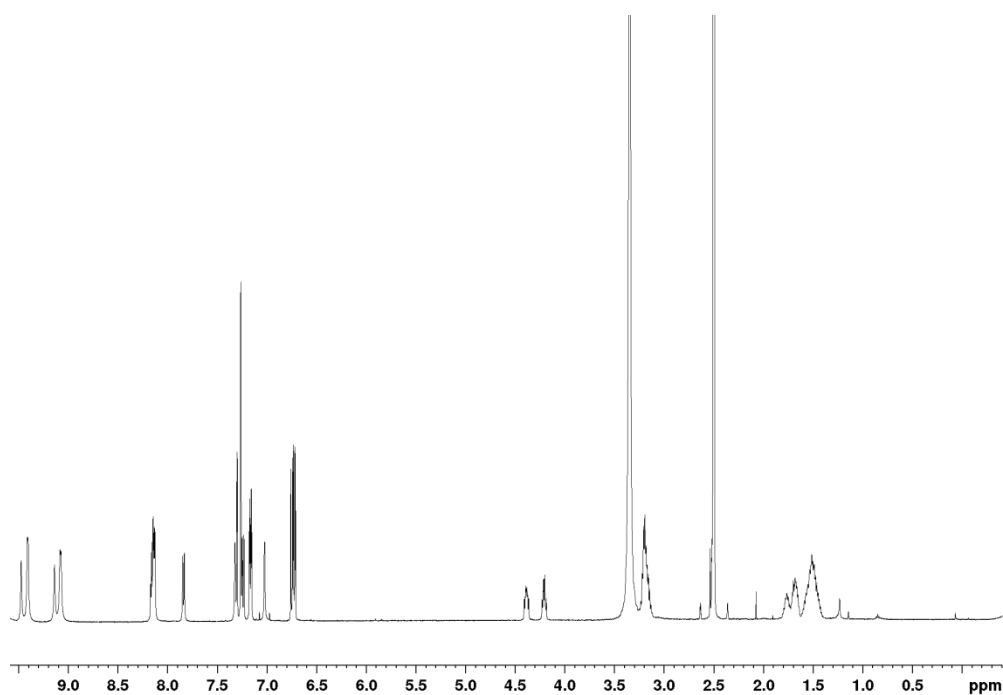
farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR: 500 MHz, 300 K, DMSO-*d*₆: δ [ppm] = 1.40-1.62 (m, 5H, D-Orn²-H_β, D-Orn^{1,2}-H_γ), 1.63-1.72 (m, 2H, D-Orn¹-H_β, D-Orn²-H_β), 1.73-1.82 (m, 1H, D-Orn¹-H_β), 3.10-3.25 (m, 4H, D-Orn^{1,2}-H_δ), 4.21 (ddd, ³*J* = 8.1, ³*J* = 8.1, ³*J* = 5.3 Hz, 1H, D-Orn²-H_α), 4.39 (ddd, ³*J* = 9.6, ³*J* = 7.9, ³*J* = 4.8 Hz, 1H, D-Orn²-H_α), 6.72 (d, ³*J* = 8.2 Hz, 1H, H-5), 6.73 (d, ³*J* = 8.2 Hz, 1H, H-5), 6.75 (d, ³*J* = 8.1 Hz, 1H, H-5), 7.03 (s, 1H, NH₂), 7.16 (dd, ³*J* = 8.2, ⁴*J* = 2.5 Hz, 1H, H-6), 7.17 (dd, ³*J* = 8.2, ⁴*J* = 2.5 Hz, 1H, H-6), 7.25 (dd, ³*J* = 8.2, ⁴*J* = 2.2 Hz, 1H, H-6), 7.26 (d, ²*J* = 2.1 Hz, 2H, H-2), 7.30 (d, ⁴*J* = 2.3 Hz, 1H, H-2), 7.32 (s, 1H, NH₂), 7.84 (d, ³*J* = 8.1 Hz, 1H, D-Orn²-NH_α), 8.13 (t, ³*J* = 5.7 Hz, 1H, Orn²-NH_δ), 8.14 (d, ³*J* = 8.0 Hz, 1H, Orn¹-NH_α), 8.15 (t, ³*J* = 6.0 Hz, 1H, Orn¹-NH_δ), 9.07 (s, 1H, 4-OH), 9.09 (s, 1H, 4-OH), 9.14 (s, 1H, 4-OH), 9.40 (s, 1H, 3-OH), 9.41 (s, 1H, 3-OH), 9.48 (s, 1H, 3-OH).

HRMS (ESI(+)): ber. für C₃₁H₃₅N₅O₁₁Na [M+Na]⁺: 676.2225; gef.: 676.2227.

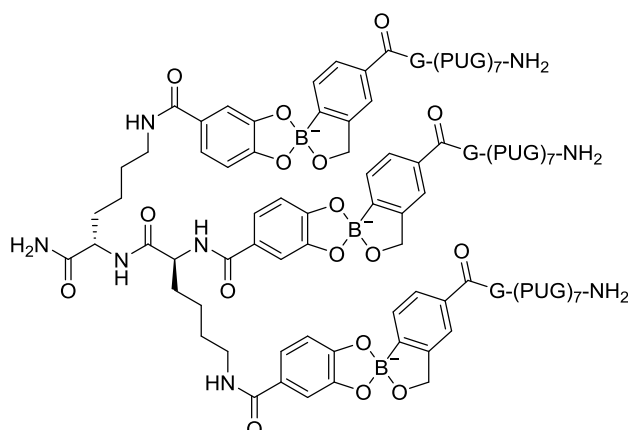
HPLC: *t*_R = 3,8 min (Gradient: 10 → 90% B in 8 min).

Experimenteller Teil



^1H -NMR: 500 MHz, 300 K, DMSO- d_6

(Borox-Gly-(Pro-Hyp-Gly)₇-NH₂)₃ @ Cat-Lys(Cat)-Lys(Cat)-NH₂ (48)



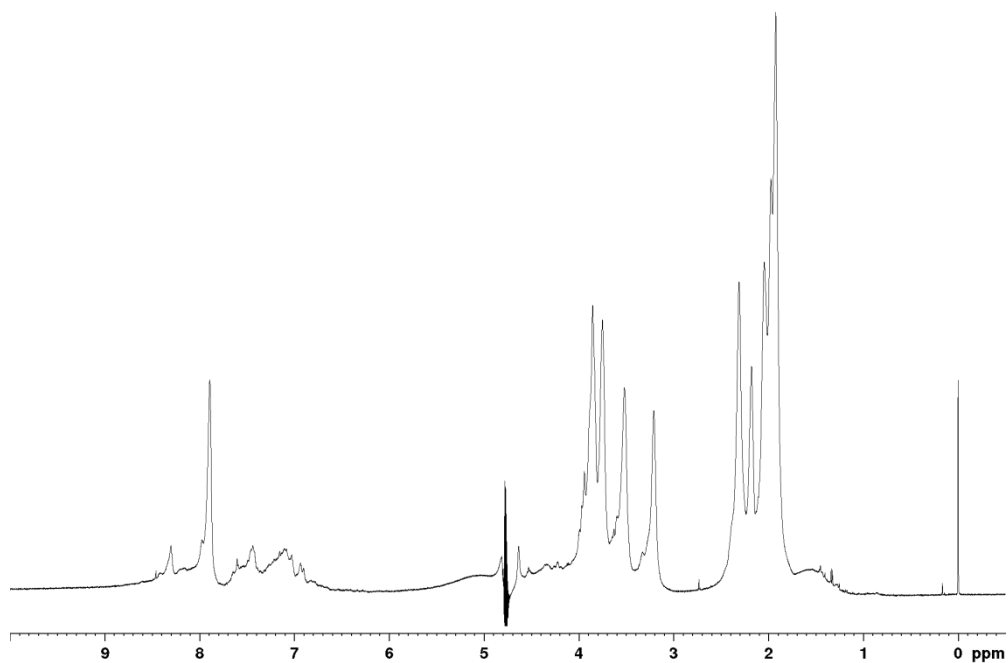
4,42 mg **Borox-Gly-(Pro-Hyp-Gly)₇-NH₂ (37)** und 477 µg **Cat-Lys(Cat)-Lys(Cat)-NH₂ (44)** wurden in Phosphatpuffer (pH = 7,4, 50 mM, 0,7 mL, 10% D₂O) gelöst und in ein NMR-Röhrchen gegeben. Dies resultierte in einer 3 mM Lösung von **37** (1 mM Lösung von **48**).

¹H-NMR: 600 MHz, 300 K, Phosphatpuffer/D₂O (Tripelhelix): δ [ppm] = 1.08-1.78 (m, 9H, Lys-H_β, Lys-H_γ, Lys-H_δ), 1.79-2.14 (m, 87H, Pro-H_γ, Pro-H_β, Hyp-H_β, Lys-H_β), 2.15-2.45 (m, 42H, Pro-H_β, Hyp-H_β), 3.00-3.40 (m, 25H, Pro-H_δ, Lys-H_ε), 3.41-3.67 (m, 21H, Pro-H_δ), 3.68-4.08 (m, 84H, Gly-H_α, Hyp-H_δ), 4.29-4.40 (m, 6H, Gly-H_α), 4.60-5.00 (m, 71H, Hyp-H_γ, Pro-H_α, Hyp-H_α, Lys-H_α, Borox-CH₂), 6.60-7.70 (m, 26H, NH₂, H_{Ar}), 7.80-8.41 (m, 28H, NH).

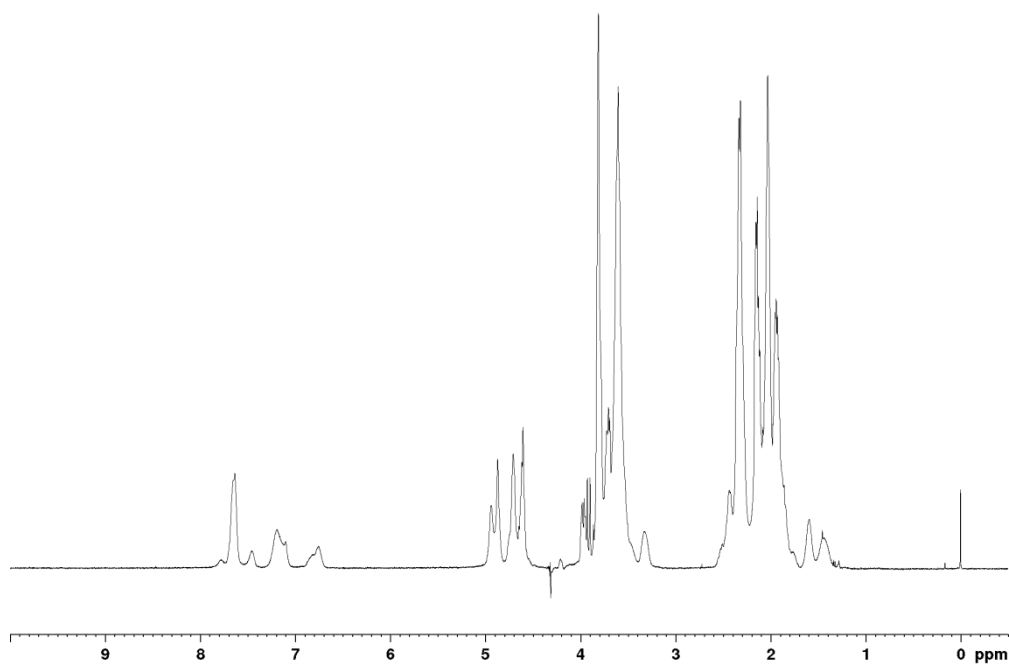
¹H-NMR: 500 MHz, 350 K, Phosphatpuffer/D₂O (Einzelstrang): δ [ppm] = 1.35-1.51 (m, 4H, Lys-H_γ), 1.52-1.67 (m, 4H, Lys-H_δ), 1.71-1.89 (m, 4H, Lys-H_β), 1.90-2.07 (m, 63H, Pro-H_γ, Pro-H_β), 2.08-2.20 (m, 21H, Hyp-H_β), 2.25-2.40 (m, 42H, Pro-H_β, Hyp-H_β), 3.22-3.40 (m, 4H, Lys-H_ε), 3.41-3.77 (m, 84H, Gly-H_α, Pro-H_δ), 3.76-3.87 (m, 42H, Hyp-H_δ), 3.88-4.02 (m, 6H, Gly-H_α), 4.40-4.50 (m, 2H, Lys-H_α), 4.56-4.78 (m, 69H, Pro-H_α, Hyp-H_α, Hyp-H_γ), 4.82-5.00 (m, 6H, Borox-CH₂), 6.68-6.91 (m, 3H, Catechol-H_{ar}), 7.02-7.29 (m, 6H, Catechol-H_{ar}), 7.38-7.83 (m, 9H, Borox-H_{ar}).

HRMS (ESI(+)): ber. für C₃₁₅H₄₂₀B₃N₇₄O₁₀₄H₅Na₂ [M+5H+2Na]⁴⁺: 1747.5106; gef.: 1747.5104.

Experimenteller Teil

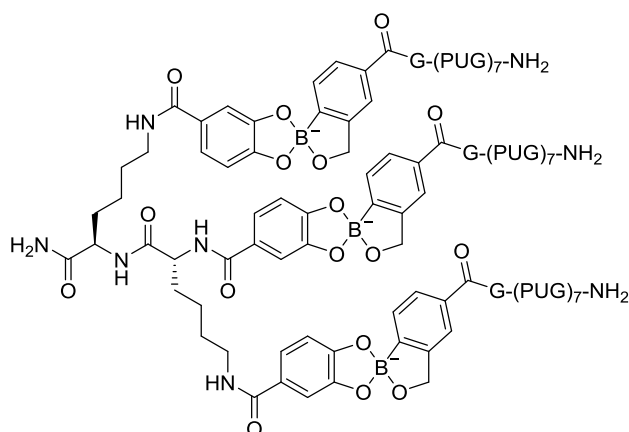


^1H -NMR: 600 MHz, 300 K, 50 mm pH = 7,4 Phosphatpuffer/ D_2O 9:1 (Tripelhelix).



^1H -NMR: 500 MHz, 350 K, 50 mm pH = 7,4 Phosphatpuffer/ D_2O 9:1 (Einzelstrang).

(Borox-Gly-(Pro-Hyp-Gly)₇-NH₂)₃ @ Cat-D-Lys(Cat)-D-Lys(Cat)-NH₂ (49)



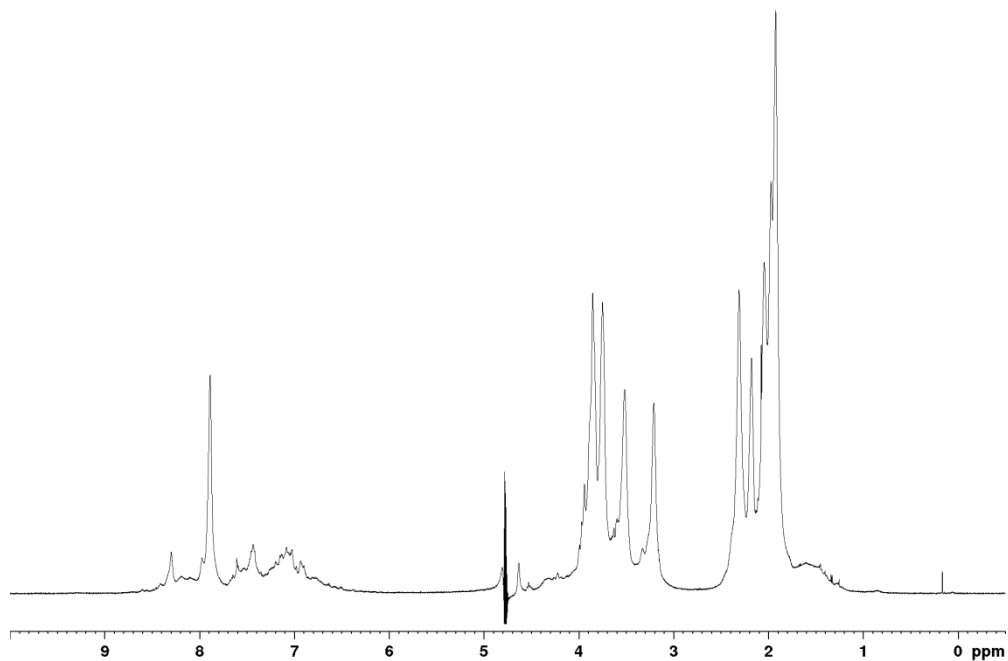
4,42 mg **Borox-Gly-(Pro-Hyp-Gly)₇-NH₂ (37)** und 477 µg **Cat-D-Lys(Cat)-D-Lys(Cat)-NH₂ (46)** wurden in Phosphatpuffer (pH = 7,4, 50 mM, 0,7 mL, 10% D₂O) gelöst und in ein NMR-Röhrchen gegeben. Dies resultierte in einer 3 mM Lösung von **37** (1 mM Lösung von **49**).

¹H-NMR: 600 MHz, 300 K, Phosphatpuffer/D₂O (Tripelhelix): δ [ppm] = 1.14-1.74 (m, 9H, D-Lys-H_β, D-Lys-H_γ, D-Lys-H_δ), 1.75-2.13 (m, 87H, Pro-H_γ, Pro-H_β, Hyp-H_β, D-Lys-H_β), 2.14-2.45 (m, 42H, Pro-H_β, Hyp-H_β), 3.11-3.41 (m, 25H, Pro-H_δ, D-Lys-H_ε), 3.42-3.67 (m, 21H, Pro-H_δ), 3.68-4.02 (m, 84H, Gly-H_α, Hyp-H_δ), 4.15-4.30 (m, 6H, Gly-H_α), 4.60-5.00 (m, 71H, Hyp-H_γ, Pro-H_α, Hyp-H_α, D-Lys-H_α, Borox-CH₂), 6.45-7.71 (m, 26H, NH₂, H_{Ar}), 7.80-8.45 (m, 28H, NH).

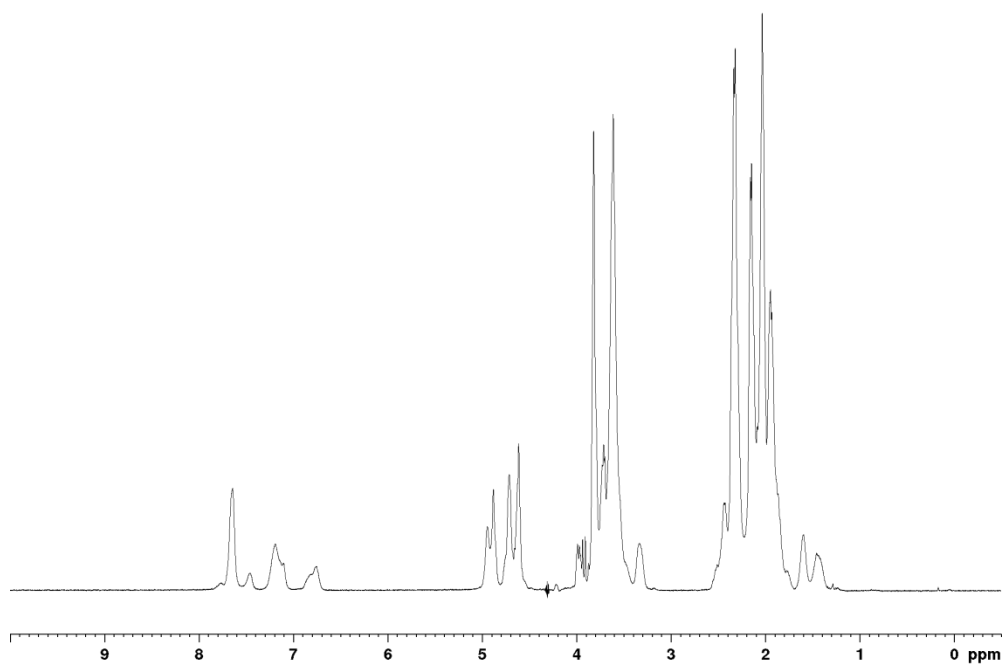
¹H-NMR: 500 MHz, 350 K, Phosphatpuffer/D₂O (Einzelstrang): δ [ppm] = 1.35-1.52 (m, 4H, Lys-H_γ), 1.53-1.68 (m, 4H, Lys-H_δ), 1.71-1.89 (m, 4H, Lys-H_β), 1.90-2.09 (m, 63H, Pro-H_γ, Pro-H_β), 2.10-2.22 (m, 21H, Hyp-H_β), 2.25-2.57 (m, 42H, Pro-H_β, Hyp-H_β), 3.23-3.39 (m, 4H, Lys-H_ε), 3.41-3.76 (m, 84H, Gly-H_α, Pro-H_δ), 3.77-3.88 (m, 42H, Hyp-H_δ), 3.89-4.03 (m, 6H, Gly-H_α), 4.40-4.50 (m, 2H, Lys-H_α), 4.50-4.80 (m, 69H, Pro-H_α, Hyp-H_α, Hyp-H_γ), 4.82-5.02 (m, 6H, Borox-CH₂), 6.65-6.90 (m, 3H, Catechol-H_{ar}), 7.02-7.30 (m, 6H, Catechol-H_{ar}), 7.38-7.88 (m, 9H, Borox-H_{ar}).

HRMS (ESI(+)): ber. für C₃₁₅H₄₂₀B₃N₇₄O₁₀₄H₈ [M+8H]⁵⁺: 1389.4174; gef.: 1389.4228.

Experimenteller Teil

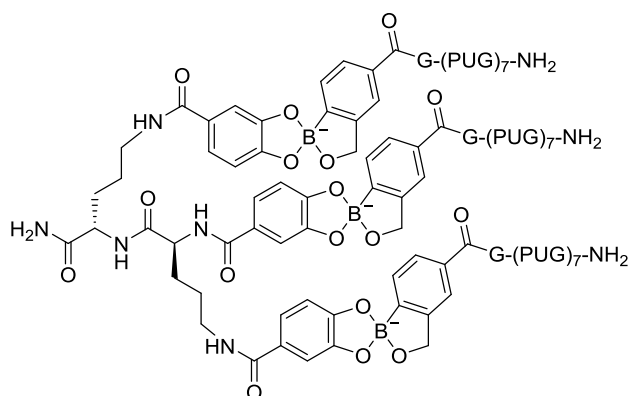


^1H -NMR: 600 MHz, 300 K, 50 mM pH = 7,4 Phosphatpuffer/ D_2O 9:1 (Tripelhelix).



^1H -NMR: 500 MHz, 350 K, 50 mM pH = 7,4 Phosphatpuffer/ D_2O 9:1 (Einzelstrang).

(Borox-Gly-(Pro-Hyp-Gly)₇-NH₂)₃ @ Cat-Orn(Cat)-Orn(Cat)-NH₂ (50)



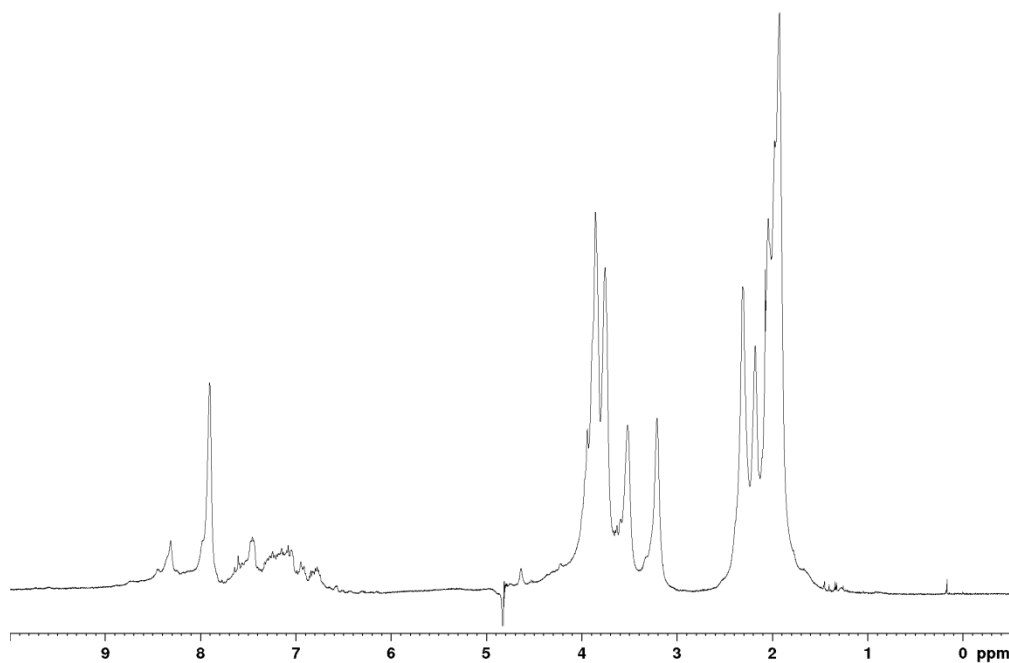
4,42 mg **Borox-Gly-(Pro-Hyp-Gly)₇-NH₂ (37)** und 457 µg **Cat-Orn(Cat)-Orn(Cat)-NH₂ (46)** wurden in Phosphatpuffer (pH = 7,4, 50 mM, 0,7 mL, 10% D₂O) gelöst und in ein NMR-Röhrchen gegeben. Dies resultierte in einer 3 mM Lösung von **37** (1 mM Lösung von **50**).

¹H-NMR: 500 MHz, 300 K, Phosphatpuffer/D₂O (Tripelhelix): δ [ppm] = 1.71-2.12 (m, 92H, Pro-H_γ, Pro-H_β, Hyp-H_β, Orn-H_β, Orn-H_γ), 2.13-2.60 (m, 42H, Pro-H_β, Hyp-H_β), 3.02-3.40 (m, 25H, Pro-H_δ, Orn-H_δ), 3.41-3.66 (m, 21H, Pro-H_δ), 3.67-4.08 (m, 84H, Gly-H_α, Hyp-H_δ), 4.29-4.40 (m, 6H, Gly-H_α), 4.60-5.00 (m, 71H, Hyp-H_γ, Pro-H_α, Hyp-H_α, Orn-H_α, Borox-CH₂), 6.50-7.75 (m, 26H, NH₂, H_{Ar}), 7.80-8.80 (m, 28H, NH).

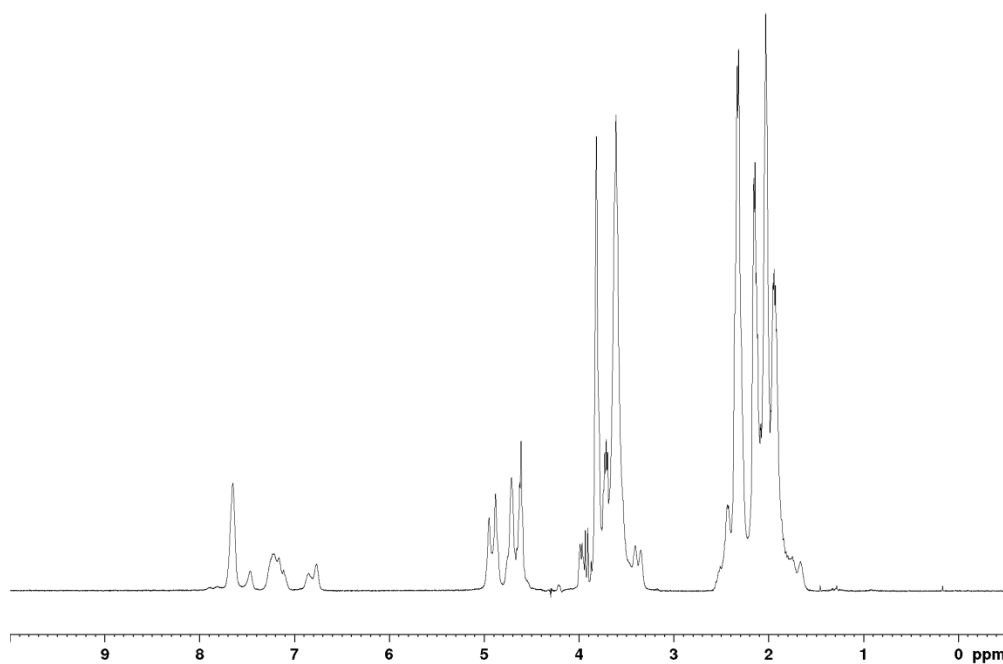
¹H-NMR: 500 MHz, 350 K, Phosphatpuffer/D₂O (Einzelstrang): δ [ppm] = 1.60-2.09 (m, 71H, Pro-H_γ, Pro-H_β, Orn-H_β, Orn-H_γ), 2.10-2.20 (m, 21H, Hyp-H_β), 2.21-2.57 (m, 42H, Pro-H_β, Hyp-H_β), 3.28-3.45 (m, 4H, Orn-H_δ), 3.49-3.76 (m, 84H, Gly-H_α, Pro-H_δ), 3.77-3.85 (m, 42H, Hyp-H_δ), 3.86-4.03 (m, 6H, Gly-H_α), 4.17-4.24 (m, 2H, Orn-H_α), 4.52-4.80 (m, 69H, Pro-H_α, Hyp-H_α, Hyp-H_γ), 4.83-5.01 (m, 6H, Borox-CH₂), 6.70-6.95 (m, 3H, Catechol-H_{ar}), 7.04-7.33 (m, 6H, Catechol-H_{ar}), 7.42-7.758 (m, 9H, Borox-H_{ar}).

HRMS (ESI(+)): ber. für C₃₁₃H₄₁₆B₃N₇₄O₁₀₄H₈ [M+8H]⁵⁺: 1383.8108; gef.: 1383.8156.

Experimenteller Teil

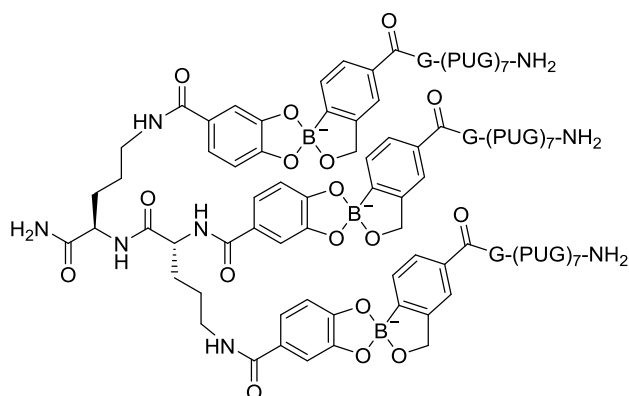


^1H -NMR: 500 MHz, 300 K, 50 mm pH = 7,4 Phosphatpuffer/ D_2O 9:1 (Tripelhelix).



^1H -NMR: 500 MHz, 350 K, 50 mm pH = 7,4 Phosphatpuffer/ D_2O 9:1 (Einzelstrang).

Borox-Gly-(Pro-Hyp-Gly)₇-NH₂)₃ @ Cat-D-Orn(Cat)-D-Orn(Cat)-NH₂ (51)



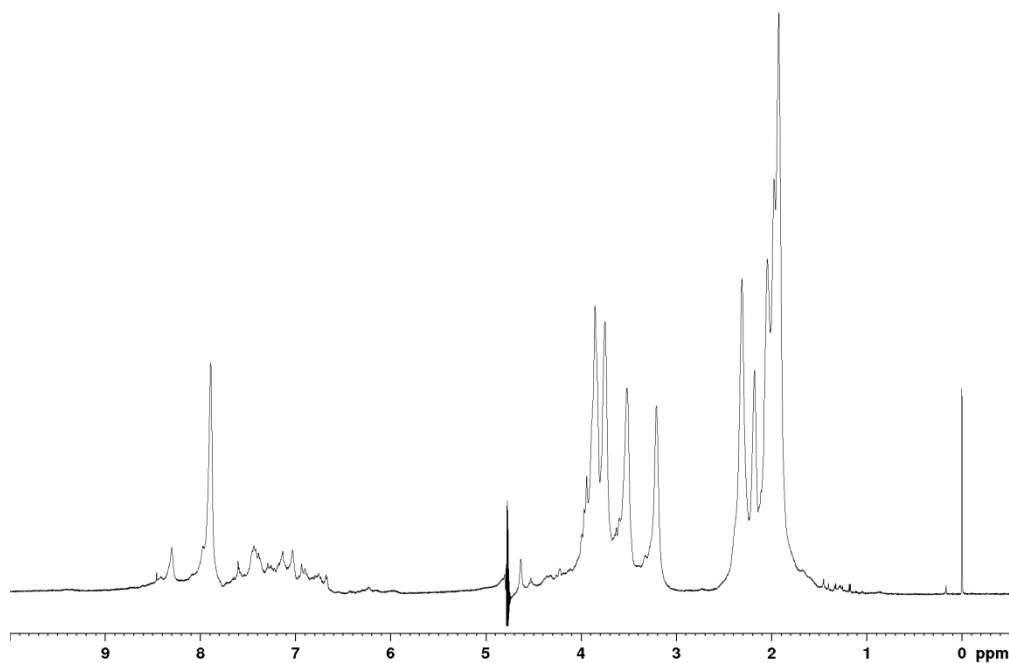
4,42 mg **Borox-Gly-(Pro-Hyp-Gly)₇-NH₂ (37)** und 457 µg **Cat-D-Orn(Cat)-D-Orn(Cat)-NH₂ (47)** wurden in Phosphatpuffer (pH = 7,4, 50 mM, 0,7 mL, 10% D₂O) gelöst und in ein NMR-Röhrchen gegeben. Dies resultierte in einer 3 mM Lösung von **37** (1 mM Lösung von **51**).

¹H-NMR: 600 MHz, 300 K, Phosphatpuffer/D₂O (Tripelhelix): δ [ppm] = 1.76-2.13 (m, 92H, Pro-H_γ, Pro-H_β, Hyp-H_β, D-Orn-H_β, D-Orn-H_γ), 2.14-2.50 (m, 42H, Pro-H_β, Hyp-H_β), 3.05-3.39 (m, 25H, Pro-H_δ, D-Orn-H_δ), 3.43-3.69 (m, 21H, Pro-H_δ), 3.68-4.03 (m, 84H, Gly-H_α, Hyp-H_δ), 4.29-4.40 (m, 6H, Gly-H_α), 4.60-5.00 (m, 71H, Hyp-H_γ, Pro-H_α, Hyp-H_α, D-Orn-H_α, Borox-CH₂), 6.60-7.79 (m, 26H, NH₂, H_{ar}), 7.80-8.46 (m, 28H, NH).

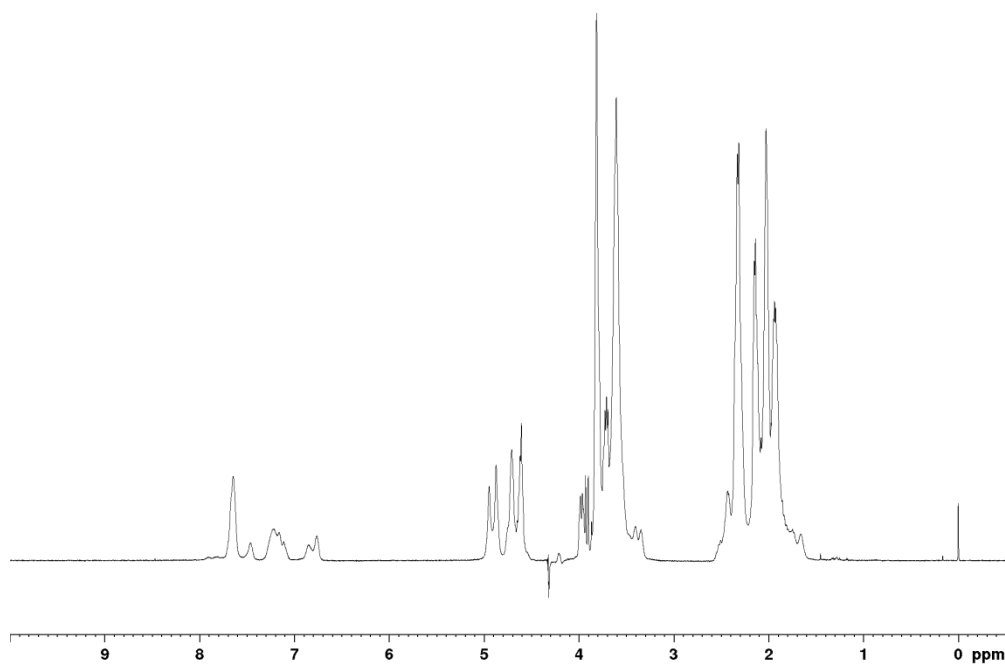
¹H-NMR: 500 MHz, 350 K, Phosphatpuffer/D₂O (Einzelstrang): δ [ppm] = 1.60-2.08 (m, 71H, Pro-H_γ, Pro-H_β, D-Orn-H_β, D-Orn-H_γ), 2.09-2.20 (m, 21H, Hyp-H_β), 2.22-2.56 (m, 42H, Pro-H_β, Hyp-H_β), 3.28-3.45 (m, 4H, D-Orn-H_δ), 3.49-3.75 (m, 84H, Gly-H_α, Pro-H_δ), 3.76-3.85 (m, 42H, Hyp-H_δ), 3.86-4.02 (m, 6H, Gly-H_α), 4.17-4.24 (m, 2H, D-Orn-H_α), 4.51-4.79 (m, 69H, Pro-H_α, Hyp-H_α, Hyp-H_γ), 4.82-5.02 (m, 6H, Borox-CH₂), 6.65-6.95 (m, 3H, Catechol-H_{ar}), 7.03-7.33 (m, 6H, Catechol-H_{ar}), 7.40-7.78 (m, 9H, Borox-H_{ar}).

HRMS (ESI(+)): ber. für C₃₁₃H₄₁₆B₃N₇₄O₁₀₄H₈ [M+8H]⁵⁺: 1383.8108; gef.: 1383.8125.

Experimenteller Teil



^1H -NMR: 600 MHz, 300 K, 50 mm pH = 7,4 Phosphatpuffer/ D_2O 9:1 (Tripelhelix).



^1H -NMR: 500 MHz, 350 K, 50 mm pH = 7,4 Phosphatpuffer/ D_2O 9:1 (Einzelstrang).

Borox-Gly-(Pro-Hyp-Gly)₇-Lys-NH₂ (52)

Borox-Gly-(Pro-Hyp-Gly)₇-Lys-NH₂ (52) wurde nach der *allgemeinen Vorschrift 1* in einer Ansatzgröße von 0,05 mm auf LL-Rink-Amid-Harz (B = 0,35 mmol/g, 100-200 mesh) synthetisiert. Die Abspaltung vom Harz erfolgte nach der *allgemeinen Vorschrift 4*. Nach Reinigung mittels semipräparativer RP-HPLC (2 → 20 B in 60 min bei 50 °C) wurde **Borox-Gly-(Pro-Hyp-Gly)₇-Lys-NH₂ (52**, 16,3 mg, 17%) als farbloser Feststoff erhalten.

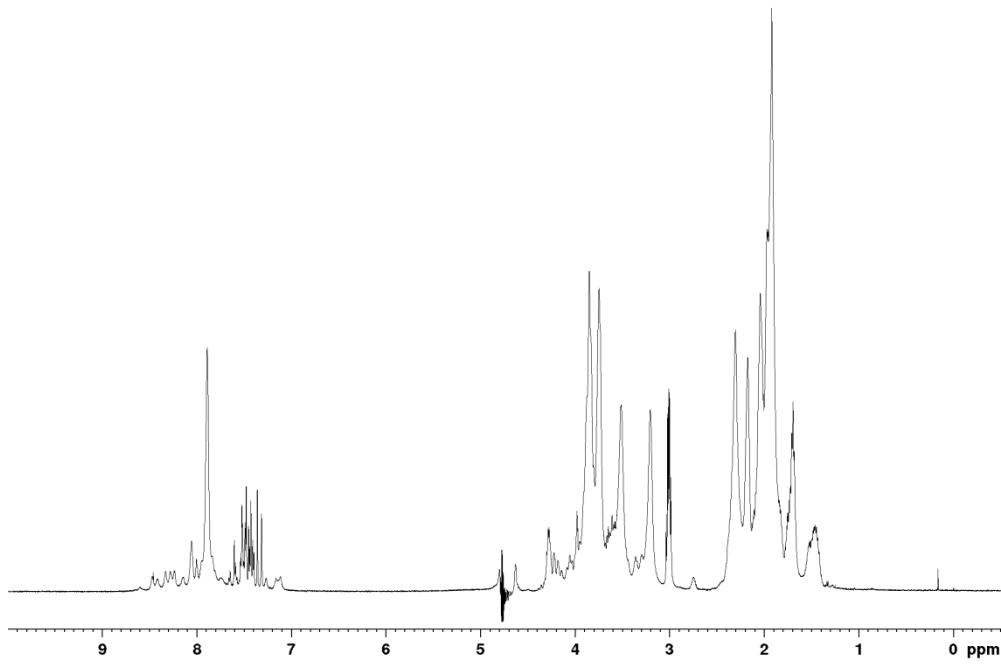
¹H-NMR: 600 MHz, 300 K, Phosphatpuffer/D₂O 9:1 (Tripelhelix): δ [ppm] = 1.38-1.60 (m, 7H, Pro-H_γ, Lys-H_γ), 1.62-1.80 (m, 8H, Pro-H_β, Pro-H_γ, Lys-H_δ), 1.81-2.12 (m, 87H, Pro-H_γ, Pro-H_β, Hyp-H_β, Lys-H_β), 2.13-2.45 (m, 42H, Pro-H_β, Hyp-H_β), 2.70-2.80 (m, 1H, Pro-H_δ), 2.95-3.07 (m, 6H, Lys-H_ε), 3.12-3.40 (m, 21H, Pro-H_δ), 3.41-3.69 (m, 20H, Pro-H_δ), 3.70-3.80 (m, 42H, Gly-H_α, Hyp-H_δ), 3.80-4.00 (m, 42H, Gly-H_α, Hyp-H_δ), 4.00-4.33 (m, 12H, Gly-H_α, Lys-H_α), 4.59-4.68 (m, 21H, Hyp-H_γ), 4.73-4.82 (m, 48H, Pro-H_α, Hyp-H_α, Borox-CH₂), 7.07-7.21 (m, 2H, NH₂), 7.27 (s, 1H, NH₂), 7.30-7.61 (m, 12H, H_{ar}, NH₂), 7.77-8.49 (m, 27H, Gly-NH, Lys-NH_α).

¹H-NMR: 500 MHz, 350 K, Phosphatpuffer /D₂O 9:1 (Einzelstrang): δ [ppm] = 1.35-1.52 (m, 2H, Lys-H_γ), 1.60-1.80 (m, 3H, Lys-H_β, Lys-H_δ), 1.80-2.10 (m, 22H, Pro-H_β, Pro-H_γ, Lys-H_β), 2.10-2.23 (m, 7H, Hyp-H_β), 2.23-2.58 (m, 14H, Hyp-H_β, Pro-H_β), 3.00 (t, ³J = 8.0 Hz, 2H, Lys-H_ε), 3.44-3.68 (m, 14H, Pro-H_δ), 3.68-4.01 (m, 23H, Gly-H_α, Hyp-H_δ, Lys-H_α), 4.18-4.28 (m, 8H, Gly-H_α), 4.55-5.01 (m, 23H, Hyp-H_α, Hyp-H_γ, Pro-H_α, Borox-CH₂), 7.54-7.72 (m, 3H, H_{ar}).

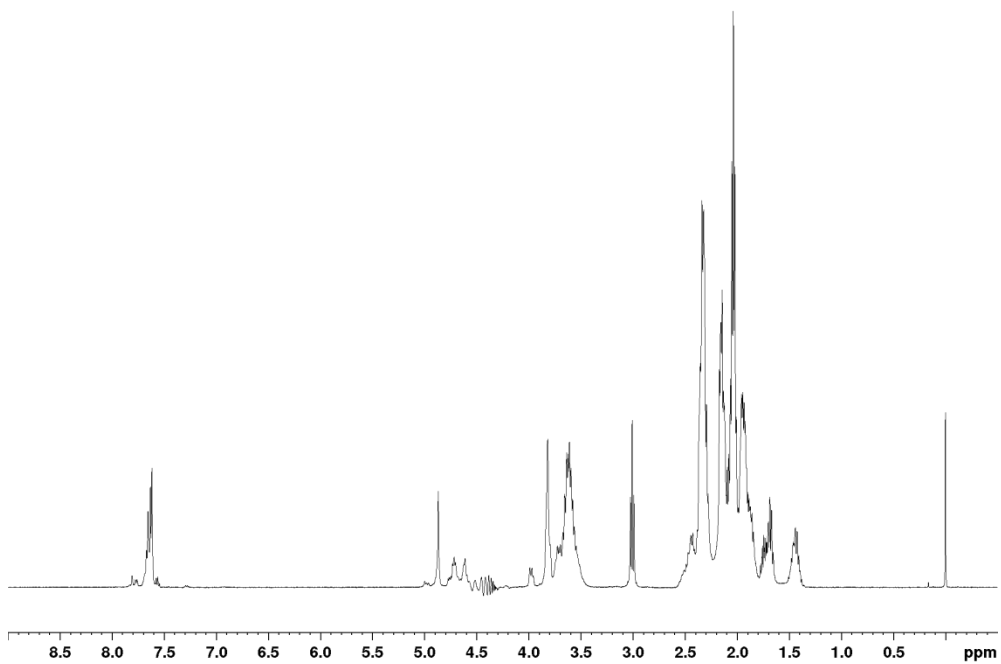
HRMS (ESI(+)): ber. für C₁₀₀H₁₄₂BN₂₅O₃₃H₂ [M+2H]²⁺: 1117.5239; gef.: 1117.5264.

HPLC: t_R = 16,0 min (Gradient: 2 → 20% B in 20 min bei 60 °C).

Experimenteller Teil

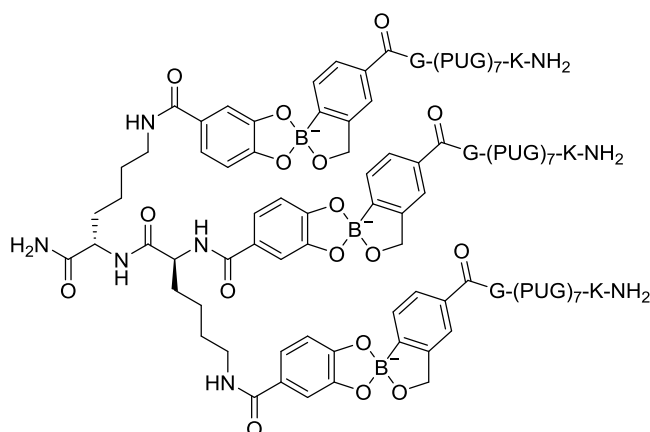


^1H -NMR: 600 MHz, 300 K, 50 mM pH = 7,4 Phosphatpuffer/ D_2O 9:1 (Tripelhelix).



^1H -NMR: 500 MHz, 350 K, 50 mM pH = 7,4 Phosphatpuffer/ D_2O 9:1 (Einzelstrang).

(Borox-Gly-(Pro-Hyp-Gly)₇-Lys-NH₂)₃ @ Cat-Lys(Cat)-Lys(Cat)-NH₂ (53)

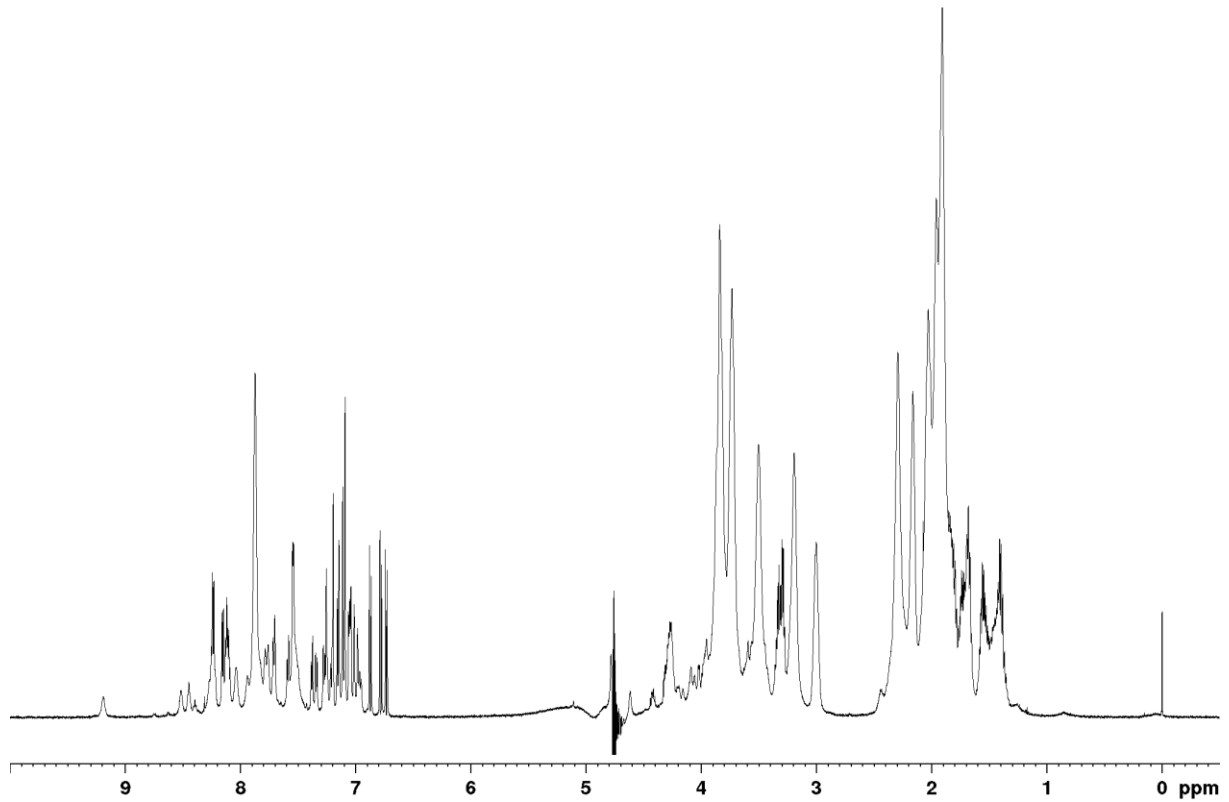


3,35 mg **Borox-Gly-(Pro-Hyp-Gly)₇-Lys-NH₂ (52)** und 341 µg **Cat-Lys(Cat)-Lys(Cat)-NH₂ (44)** wurden in Phosphatpuffer (pH = 7,4, 50 mM, 0,5 mL, 10% D₂O) gegeben. Dies resultierte in einer 3 mM Lösung von **52** (1 mM Lösung von **53**). Es bildete sich sofort ein farbloser Niederschlag. Die Lösung wurde

zentrifugiert und die überstehende Lösung abdekantiert. Der Rückstand wurde mit H₂O (2 x 450 µL) gewaschen. Der Niederschlag wurde daraufhin in Phosphatpuffer (pH = 3, 50 mM, 0,5 mL, 10% D₂O) gelöst. Im ¹H-NMR-Spektrum lagen **52** und **44** im Verhältnis 3:1 nebeneinander vor.

¹H-NMR: 600 MHz, 300 K, Phosphatpuffer/D₂O 9:1: δ [ppm] = 1.31-1.78 (m, 25H, Lys-H_β, Lys-H_γ, Lys-H_δ), 1.79-2.11 (m, 92H, Pro-H_γ, Pro-H_β, Hyp-H_β, Lys-H_β), 2.13-2.50 (m, 42H, Pro-H_β, Hyp-H_β), 2.95-3.07 (m, 6H, Lys-H_ε), 3.10-3.40 (m, 25H, Pro-H_δ, Lys-H_ε), 3.41-3.64 (m, 20H, Pro-H_δ), 3.65-3.79 (m, 42H, Gly-H_α, Hyp-H_δ), 3.80-4.00 (m, 42H, Gly-H_α, Hyp-H_δ), 4.00-4.46 (m, 14H, Gly-H_α, Lys-H_α), 4.59-4.68 (m, 21H, Hyp-H_γ), 4.73-4.82 (m, 48H, Pro-H_α, Hyp-H_α, Borox-CH₂), 6.73 (d, ³J = 8,3 Hz, 1H, H_{ar}), 6.76 (d, ³J = 8,3 Hz, 1H, H_{ar}), 6.87 (d, ³J = 8.3 Hz, 1H, H_{ar}), 6.94-7.81 (m, 25H, H_{ar}, Lys-NH_ε, NH₂), 7.81-8.55 (m, 27H, Gly-NH, Lys-NH_α), 9.20 (s, 6H, OH).

Experimenteller Teil



^1H -NMR: 600 MHz, 300 K, 50 mM pH = 3 Phosphatpuffer/ D_2O 9:1 (Tripelhelix und Lys-cap liegen nebeneinander vor).

Borox-Gly-(Pro-Hyp-Gly)₇-Lys(Ac)-NH₂ (54)

Borox-Gly-(Pro-Hyp-Gly)₇-Lys(Ac)-NH₂ (54) wurde nach der *allgemeinen Vorschrift 1* in einer Ansatzgröße von 0,05 mm auf LL-Rink-Amid-Harz (B = 0,35 mmol/g, 100-200 mesh) synthetisiert. Die Abspaltung vom Harz erfolgte nach der *allgemeinen Vorschrift 4*. Nach Reinigung (20 mg von 68,3 mg Rohpeptid) mittels semipräparativer RP-HPLC (2 → 20 B in 60 min bei 50 °C) wurde **Borox-Gly-(Pro-Hyp-Gly)₇-Lys-NH₂ (54, 7,3 mg)** als farbloser Feststoff erhalten.

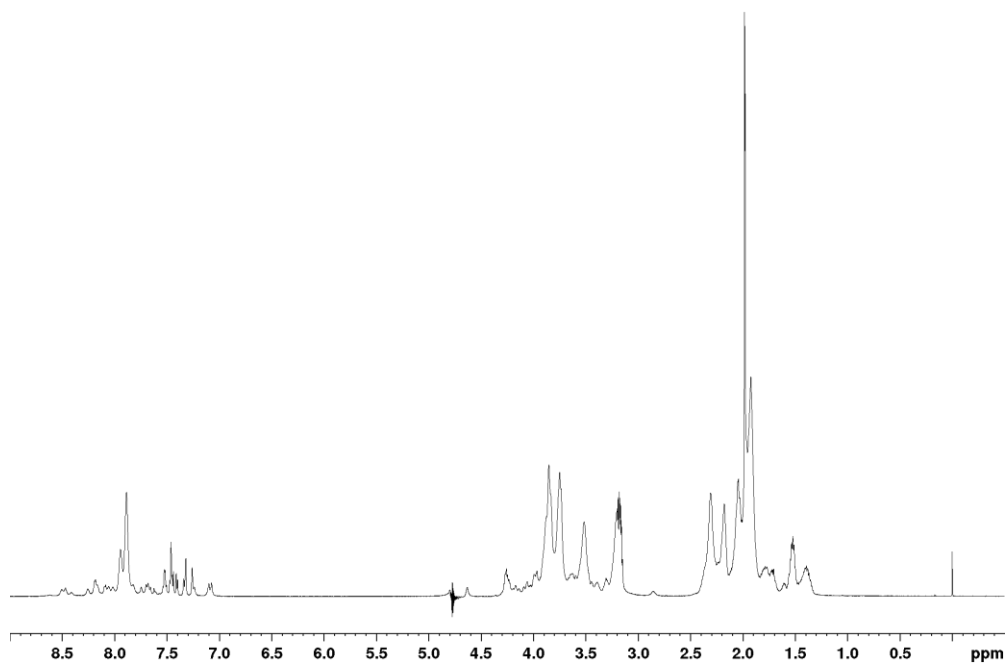
¹H-NMR: 600 MHz, 300 K, Phosphatpuffer/D₂O 9:1 (Tripelhelix): δ [ppm] = 1.30-1.65 (m, 13H, Pro-H_γ, Lys-H_γ, Lys-H_δ), 1.66-1.85 (m, 8H, Pro-H_β, Pro-H_γ, Lys-H_β), 1.81-2.13 (m, 90H, Pro-H_γ, Pro-H_β, Hyp-H_β, Ac), 2.13-2.47 (m, 42H, Pro-H_β, Hyp-H_β), 2.80-2.92 (m, 1H, Pro-H_δ), 3.08-3.42 (m, 27H, Pro-H_δ, Lys-H_ε), 3.42-3.67 (m, 20H, Pro-H_δ), 3.69-3.80 (m, 42H, Gly-H_α, Hyp-H_δ), 3.80-4.03 (m, 42H, Gly-H_α, Hyp-H_δ), 4.04-4.30 (m, 12H, Gly-H_α, Lys-H_α), 4.60-4.66 (m, 21H, Hyp-H_γ), 4.73-4.82 (m, 48H, Pro-H_α, Hyp-H_α, Borox-CH₂), 7.07 (s, 1H, NH₂), 7.15 (s, 1H, NH₂), 7.21-7.28 (m, 4H, NH₂, Lys-NH_ε), 7.30-7.64 (m, 12H, H_{ar}, NH₂), 8.00-8.55 (m, 27H, Gly-NH, Lys-NH_α).

¹H-NMR: 500 MHz, 350 K, Phosphatpuffer /D₂O 9:1 (Einzelstrang): δ [ppm] = 1.30-1.45 (m, 2H, Lys-H_γ), 1.45-1.58 (m, 2H, Lys-H_δ), 1.65-1.77 (m, 1H, Lys-H_β), 1.80-2.10 (m, 24H, Pro-H_β, Pro-H_γ, Lys-H_β, Ac), 2.10-2.23 (m, 7H, Hyp-H_β), 2.23-2.58 (m, 14H, Hyp-H_β, Pro-H_β), 3.16 (t, ³J = 7.2 Hz, 2H, Lys-H_ε), 3.43-3.68 (m, 14H, Pro-H_δ), 3.68-4.02 (m, 23H, Gly-H_α, Hyp-H_δ, Lys-H_α), 4.19-4.27 (m, 8H, Gly-H_α), 4.52-5.02 (m, 23H, Hyp-H_α, Hyp-H_γ, Pro-H_α, Borox-CH₂), 7.62-7.77 (m, 3H, H_{ar}).

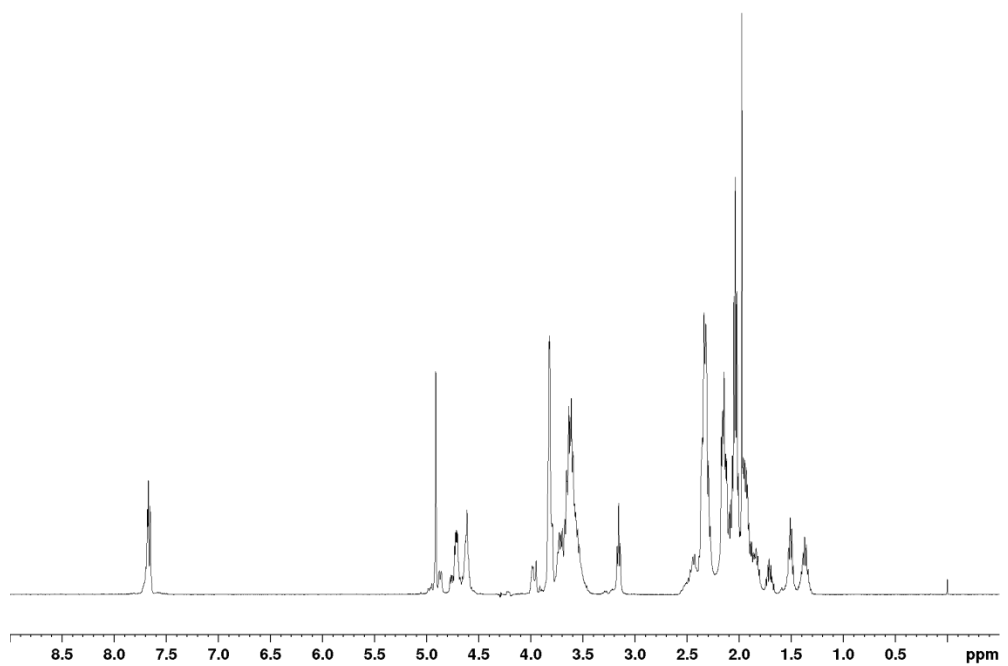
HRMS (ESI(+)): ber. für C₁₀₂H₁₄₄BN₂₅O₃₄H₂ [M+2H]²⁺: 1138.5292; gef.: 1138.5302.

HPLC: t_R = 17,0 min (Gradient: 2 → 20% B in 20 min bei 60 °C).

Experimenteller Teil

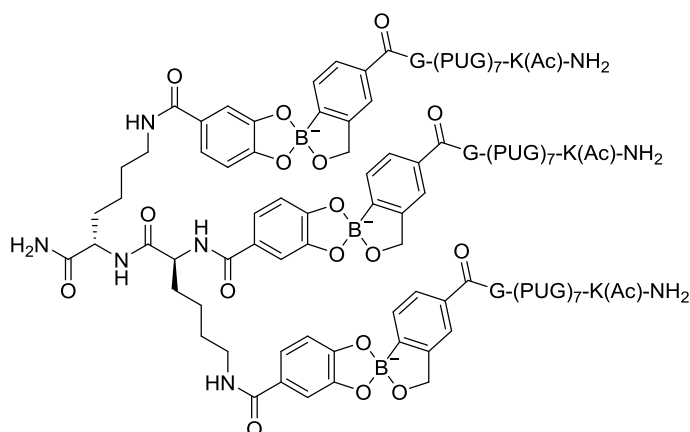


^1H -NMR: 600 MHz, 300 K, 50 mM pH = 7,4 Phosphatpuffer/ D_2O 9:1 (Tripelhelix).



^1H -NMR: 500 MHz, 350 K, 50 mM pH = 7,4 Phosphatpuffer/ D_2O 9:1 (Einzelstrang).

(Borox-Gly-(Pro-Hyp-Gly)₇-Lys(Ac)-NH₂)₃ @ Cat-Lys(Cat)-Lys(Cat)-NH₂ (55)

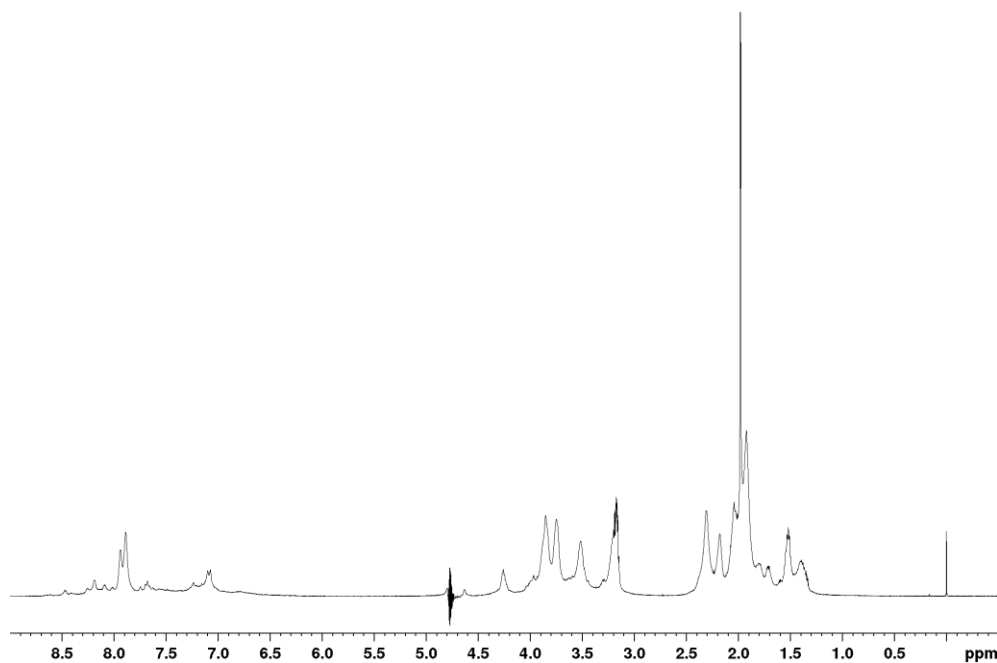


4,09 mg **Borox-Gly-(Pro-Hyp-Gly)₇-Lys(Ac)-NH₂ (54)** und 409 µg **Cat-Lys(Cat)-Lys(Cat)-NH₂ (44)** wurden in Phosphatpuffer (pH = 7,4, 50 mM, 0,6 mL, 10% D₂O) gelöst und in ein NMR-Röhrchen gegeben. Dies resultierte in einer 3 mM Lösung von **54** (1 mM Lösung von **55**).

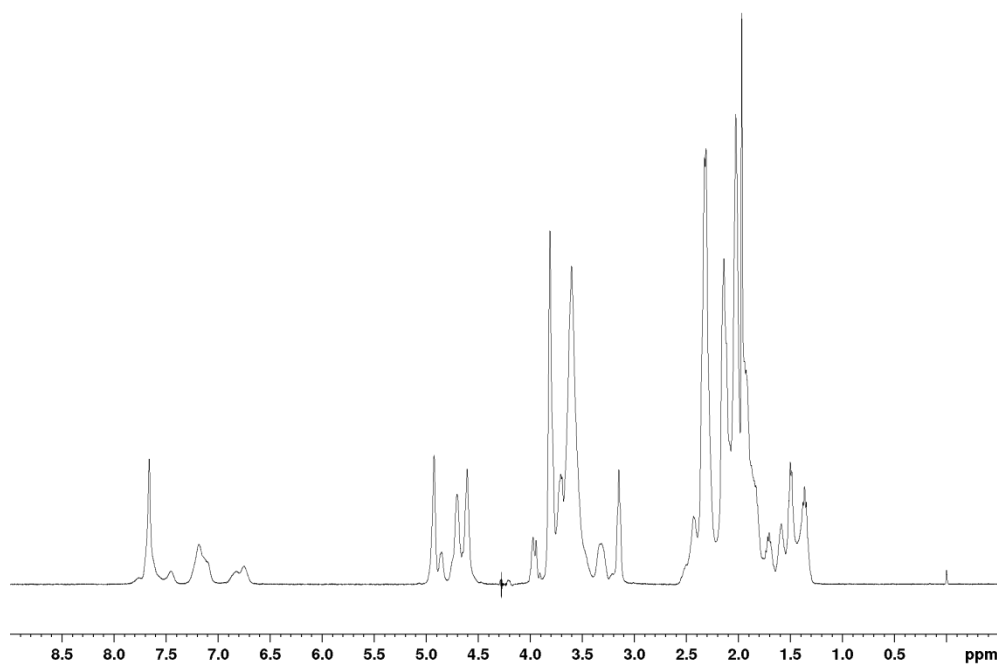
¹H-NMR: 600 MHz, 300 K, Phosphatpuffer/D₂O (Tripelhelix): δ [ppm] = 1.08-1.85 (m, 30H, Lys-H_β, Lys-H_γ, Lys-H_δ), 1.86-2.13 (m, 90H, Pro-H_γ, Pro-H_β, Hyp-H_β, Ac), 2.14-2.41 (m, 42H, Pro-H_β, Hyp-H_β), 3.00-3.38 (m, 31H, Pro-H_δ, Lys-H_ε), 3.43-3.68 (m, 21H, Pro-H_δ), 3.68-4.08 (m, 84H, Gly-H_α, Hyp-H_δ), 4.21-4.32 (m, 9H, Gly-H_α, Lys-H_α), 4.60-5.00 (m, 71H, Hyp-H_γ, Pro-H_α, Hyp-H_α, Lys-H_α, Borox-CH₂), 6.60-7.70 (m, 26H, NH₂, H_{ar}), 7.84-8.65 (m, 28H, NH).

¹H-NMR: 500 MHz, 350 K, Phosphatpuffer/D₂O (Einzelstrang): δ [ppm] = 1.29-1.80 (m, 30H, Lys-H_β, Lys-H_γ, Lys-H_δ), 1.80-2.07 (m, 72H, Pro-H_γ, Pro-H_β, Ac), 2.08-2.21 (m, 21H, Hyp-H_β), 2.22-2.56 (m, 42H, Pro-H_β, Hyp-H_β), 3.08-3.25 (m, 6H, Lys-H_ε), 3.25-3.40 (m, 4H, Lys-H_ε), 3.43-3.75 (m, 84H, Gly-H_α, Pro-H_δ), 3.76-3.87 (m, 42H, Hyp-H_δ), 3.90-4.02 (m, 6H, Gly-H_α), 4.18-4.30 (m, 5H, Lys-H_α), 4.56-4.79 (m, 69H, Pro-H_α, Hyp-H_α, Hyp-H_γ), 4.80-5.02 (m, 6H, Borox-CH₂), 6.65-6.91 (m, 3H, Catechol-H_{ar}), 7.02-7.29 (m, 6H, Catechol-H_{ar}), 7.39-7.85 (m, 9H, Borox-H_{ar}).

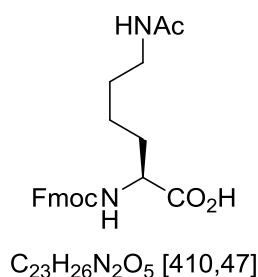
Experimenteller Teil



^1H -NMR: 600 MHz, 300 K, 50 mM pH = 7,4 Phosphatpuffer/ D_2O 9:1 (Tripelhelix).



^1H -NMR: 500 MHz, 350 K, 50 mM pH = 7,4 Phosphatpuffer/ D_2O 9:1 (Einzelstrang).

Fmoc-Lys(Ac)-OH (56)^[356, 357]

5,00 g **Fmoc-Lys(Boc)-OH** (10,7 mmol, 1,00 Äq.) wurde in DCM/TFA (4:1, 100 mL) gelöst und 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in DCM (100 mL) gelöst und mit 5,58 mL DIPEA (32,1 mmol, 3,00 Äq.) versetzt. Nach der Zugabe von 3,03 mL Ac₂O (32,1 mmol, 3,00 Äq.) wurde 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Nun wurde 1 M HCl_{aq} (250 mL) zugegeben. Der Niederschlag wurde abfiltriert und *in vacuo* getrocknet. **Fmoc-Lys(Ac)-OH (56)**, 3,53 g, 81%) wurde als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR: 300 MHz, 300 K, DMSO-*d*₆: δ [ppm] = 1.23-1.48 (m, 4H, H_γ, H_δ), 1.50-1.73 (m, 2H, H_β), 1.78 (s, 3H, Ac), 2.94-3.08 (m, 2H, H_ε), 3.83-3.97 (m, 1H, H_α), 4.16-4.35 (m, 3H, 9-H, Fmoc-CH₂), 7.28-7.47 (m, 4H, H_{ar}), 7.60 (d, ³*J* = 7.6 Hz, 1H, NH_α), 7.68-7.83 (m, 3H, H_{ar}, NH_ε), 7.85-7.93 (m, 2H, H_{ar}), 12.55 (sbr, 1H, CO₂H).

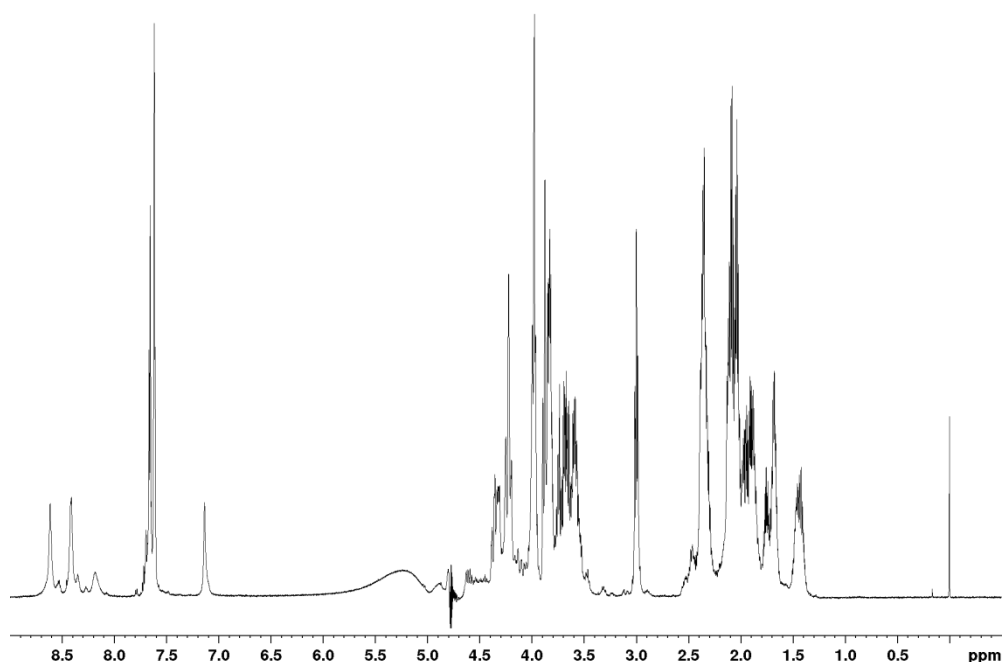
Borox-Gly-(Pro-Hyp-Gly)₃-Lys-NH₂ (57)

Borox-Gly-(Pro-Hyp-Gly)₃-Lys-NH₂ (57) wurde nach der *allgemeinen Vorschrift 1* in einer Ansatzgröße von 0,05 mm auf LL-Rink-Amid-Harz (B = 0,35 mmol/g, 100-200 mesh) synthetisiert. Die Abspaltung vom Harz erfolgte nach der *allgemeinen Vorschrift 4*. Nach Reinigung mittels semipräparativer RP-HPLC (2 → 20 B in 60 min bei 50 °C) wurde **Borox-Gly-(Pro-Hyp-Gly)₃-Lys-NH₂ (57)** als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR: 600 MHz, 300 K, Phosphatpuffer/D₂O 9:1 (Einzelstrang): δ [ppm] = 1.35-1.52 (m, 2H, Lys-H_γ), 1.60-1.71 (m, 2H, Lys-H_δ), 1.71-1.81 (m, 1H, Lys-H_β), 1.81-2.00 (m, 4H, Pro-H_β, Lys-H_β), 2.01-2.16 (m, 9H, Hyp-H_β, Pro-H_γ), 2.25-2.42 (m, 6H, Hyp-H_β, Pro-H_β), 2.95-3.03 (m, 2H, Lys-H_ε), 3.50-3.77 (m, 6H, Pro-H_δ), 3.78-3.92 (m, 6H, Hyp-H_δ), 3.93-4.02 (m, 4H, Gly-H_α), 4.18-4.40 (m, 5H, Gly-H_α, Lys-H_α), 4.55-4.90 (m, 11H, Hyp-H_α, Hyp-H_γ, Pro-H_α, Borox-CH₂), 7.14. (s, 1H, NH₂), 7.55-7.77 (m, 4H, H_{ar}, NH₂), 8.10-8.72 (m, 7H, Gly-NH, Lys-NH_α, Lys-NH_ε).

HRMS (ESI(+)): ber. für C₅₂H₇₄BN₁₃O₁₇H [M+H]⁺: 1164.5500; gef.: 1164.5498.

HPLC: $t_R = 14,7$ min (Gradient: 2 → 20% B in 20 min bei 60 °C).



$^1\text{H-NMR}$: 600 MHz, 300 K, 50 mM pH = 7,4 Phosphatpuffer/ D_2O 9:1 (Einzelstrang).

Borox-Gly-(Pro-Hyp-Gly)₅-Lys-NH₂ (58)

Borox-Gly-(Pro-Hyp-Gly)₅-Lys-NH₂ (58) wurde nach der *allgemeinen Vorschrift 1* in einer Ansatzgröße von 0,05 mm auf LL-Rink-Amid-Harz (B = 0,35 mmol/g, 100-200 mesh) synthetisiert. Die Abspaltung vom Harz erfolgte nach der *allgemeinen Vorschrift 4*. Nach Reinigung mittels semipräparativer RP-HPLC (2 → 20 B in 60 min bei 50 °C) wurde **Borox-Gly-(Pro-Hyp-Gly)₅-Lys-NH₂ (58, 10,5 mg)** als farbloser Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$: 600 MHz, 280 K, Phosphatpuffer/ D_2O 9:1 (Tripelhelix): δ [ppm] = 1.39-1.62 (m, 6H, Lys- H_γ), 1.62-1.80 (m, 9H, Lys- H_δ , Lys- H_β), 1.80-2.14 (m, 66H, Pro- H_β , Hyp- H_β , Pro- H_γ , Lys- H_β), 2.14-2.45 (m, 30H, Hyp- H_β , Pro- H_β), 2.75-2.88 (m, 1H, Pro- H_δ), 2.95-3.06 (m, 6H, Lys- H_ϵ), 3.11-3.40 (m, 15H, Pro- H_δ), 3.41-3.69 (m, 14H, Pro- H_δ), 3.70-4.07 (m, 30H, Gly- H_α , Hyp- H_δ), 4.17-4.43 (m, 9H, Gly- H_α , Lys- H_α), 4.59-4.70 (m, 15H, Hyp- H_γ), 4.73-5.08 (m, 36H, Pro- H_α , Hyp- H_α , Borox- CH_2), 7.16-7.56 (m, 15H, H_{ar} , NH_2), 7.88-8.66 (m, 21H, Gly-NH, Lys- NH_α).

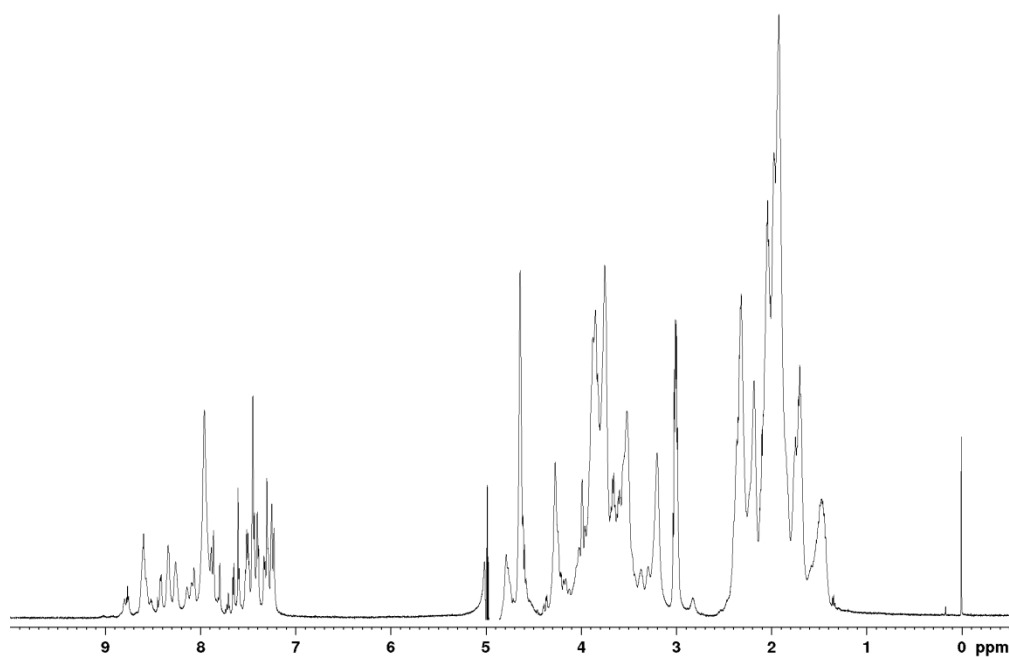
Experimenteller Teil

¹H-NMR: 600 MHz, 320 K, Phosphatpuffer/D₂O 9:1 (Einzelstrang): δ [ppm] = 1.37-1.52 (m, 2H, Lys-H_γ), 1.62-1.80 (m, 3H, Lys-H_δ, Lys-H_β), 1.80-2.20 (m, 22H, Pro-H_β, Hyp-H_β, Pro-H_γ Lys-H_β), 2.22-2.57 (m, 10H, Hyp-H_β, Pro-H_β), 3.00 (t, ³J = 8.2 Hz, 2H, Lys-H_ε), 3.44-3.77 (m, 10H, Pro-H_δ), 3.79-3.90 (m, 10H, Hyp-H_δ), 3.92-4.04 (m, 10H, Gly-H_α), 4.10-4.40 (m, 3H, Gly-H_α, Lys-H_α), 4.65-4.77 (m, 5H, Hyp-H_γ), 4.87-5.04 (m, 12H, Pro-H_α, Hyp-H_α, Borox-CH₂), 7.03 (s_{br}, 2H, NH₂) 7.46-7.77 (m, 3H, H_{ar}), 8.08-8.57 (m, 7H, Gly-NH, Lys-NH_α).

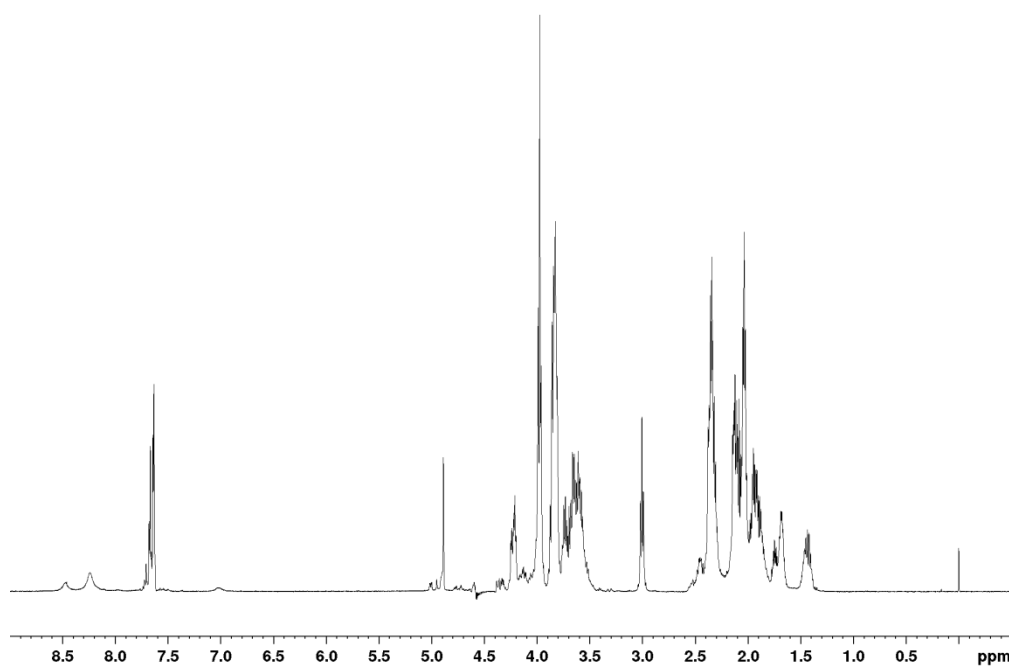
HRMS (ESI(+)): ber. für C₇₆H₁₀₈BN₁₉O₂₅H₂ [M+2H]²⁺: 849.9007; gef.: 849.9012.

HPLC: t_R = 14,6 min (Gradient: 2 → 20% B in 20 min bei 60 °C).

Experimenteller Teil

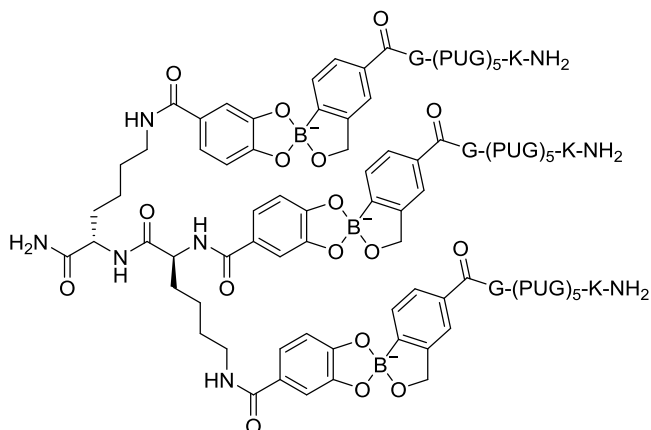


^1H -NMR: 600 MHz, 280 K, 50 mM pH = 7,4 Phosphatpuffer/ D_2O 9:1 (Tripelhelix).



^1H -NMR: 600 MHz, 320 K, 50 mM pH = 7,4 Phosphatpuffer/ D_2O 9:1 (Einzelstrang).

(Borox-Gly-(Pro-Hyp-Gly)₅-Lys-NH₂)₃ @ Cat-Lys(Cat)-Lys(Cat)-NH₂ (59)

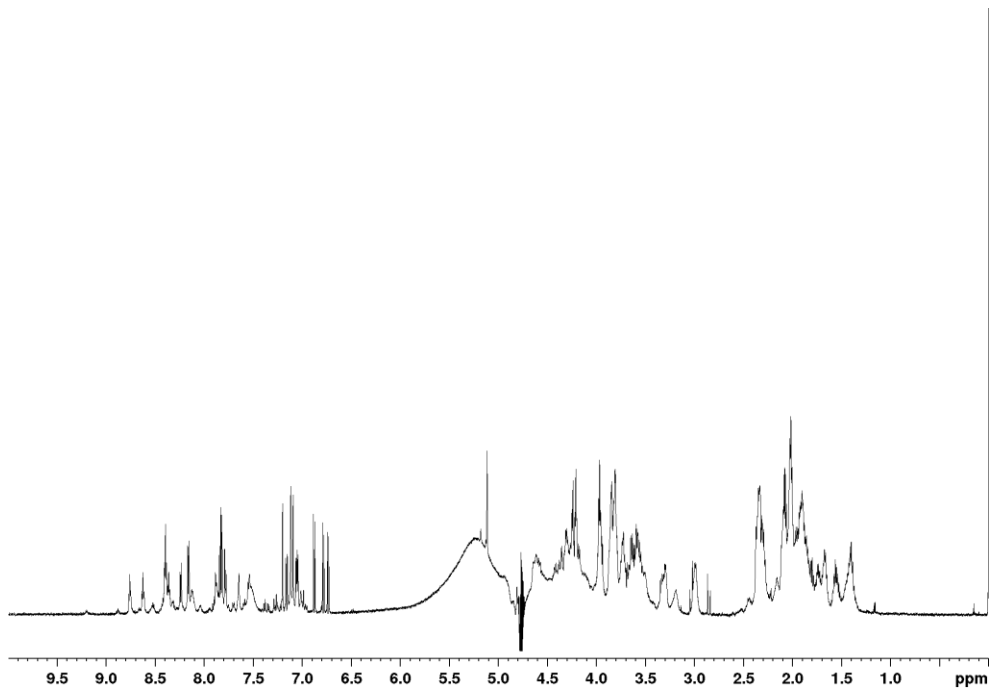


3,06 mg **Borox-Gly-(Pro-Hyp-Gly)₅-Lys-NH₂ (58)** und
409 µg **Cat-Lys(Cat)-Lys(Cat)-NH₂ (44)** wurden in
Phosphatpuffer (pH = 7,4,
50 mM, 0,6 mL, 10% D₂O)
gegeben. Dies resultierte in
einer 3 mM Lösung von **58**
(1 mM Lösung von **59**). Es

bildete sich sofort ein farbloser Niederschlag. Die Lösung wurde zentrifugiert und die überstehende Lösung abdekantiert. Der Rückstand wurde mit H₂O (2 x 450 µL) gewaschen. Der Niederschlag wurde daraufhin in Phosphatpuffer (pH = 3, 50 mM, 0,5 mL, 10% D₂O) gelöst. Im ¹H-NMR-Spektrum lagen **58** und **44** im Verhältnis 3:1 nebeneinander vor.

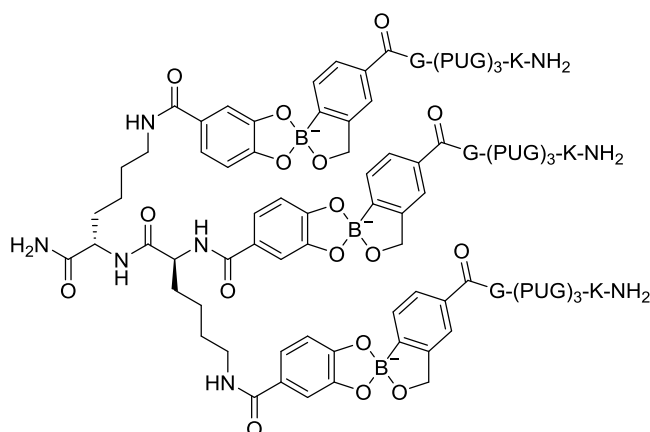
¹H-NMR: 600 MHz, 300 K, Phosphatpuffer/D₂O 9:1: δ [ppm] = 1.30-1.76 (m, 25H, Lys-H_β, Lys-H_γ, Lys-H_δ), 1.77-2.13 (m, 65H, Pro-H_γ, Pro-H_β, Hyp-H_β, Lys-H_β), 2.14-2.48 (m, 30H, Pro-H_β, Hyp-H_β), 2.93-3.05 (m, 6H, Lys-H_ε), 3.12-3.35 (m, 19H, Pro-H_δ, Lys-H_ε), 3.40-3.69 (m, 15H, Pro-H_δ), 3.70-4.00 (m, 60H, Gly-H_α, Hyp-H_δ), 4.00-4.67 (m, 26H, Hyp-H_γ, Gly-H_α, Lys-H_α), 4.73-4.82 (m, 36H, Pro-H_α, Hyp-H_α, Borox-CH₂), 6.73 (d, ³J = 8,3 Hz, 1H, H_{ar}), 6.78 (d, ³J = 8,3 Hz, 1H, H_{ar}), 6.87 (d, ³J = 8,3 Hz, 1H, H_{ar}), 6.94-7.85 (m, 23H, H_{ar}, NH₂), 7.90-8.79 (m, 25H, Gly-NH, Lys-NH_α, Lys-NH_ε).

Experimenteller Teil



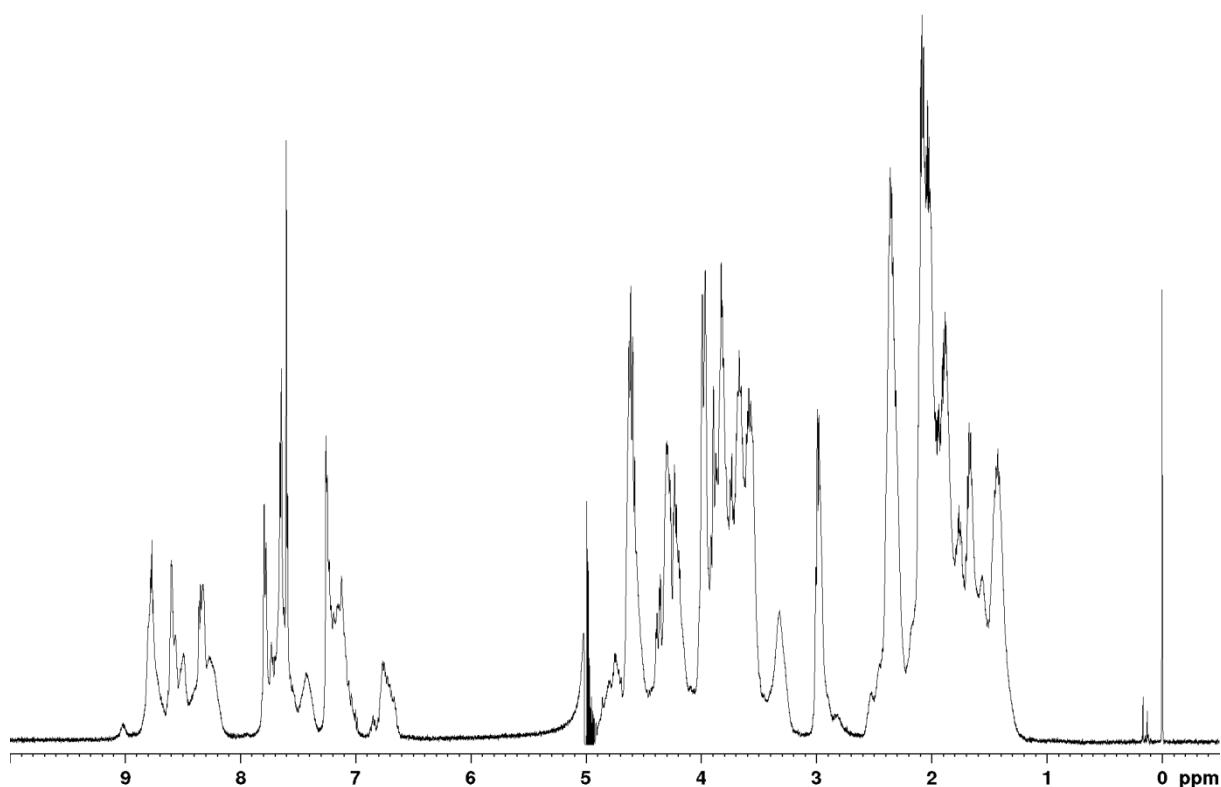
¹H-NMR: 600 MHz, 300 K, 50 mM pH = 3 Phosphatpuffer/D₂O 9:1 (Tripelhelix, Einzelstrang und Lys-cap liegen nebeneinander vor).

(Borox-Gly-(Pro-Hyp-Gly)₃-Lys-NH₂)₃ @ Cat-Lys(Cat)-Lys(Cat)-NH₂ (60)



2,06 mg **Borox-Gly-(Pro-Hyp-Gly)₃-Lys-NH₂ (57)** und 409 µg **Cat-Lys(Cat)-Lys(Cat)-NH₂ (44)** wurden in Phosphatpuffer (pH = 7,4, 50 mM, 0,6 mL, 10% D₂O) gegeben. Dies resultierte in einer 3 mM Lösung von **57** (1 mM Lösung von **60**). Das ¹H-NMR-Spektrum zeigt eine komplexe Mischung aus verschiedenen

Boroxolestern, sowie ungebundenes **Borox-Gly-(Pro-Hyp-Gly)₃-Lys-NH₂ (57)** was eine Zuordnung nicht möglich macht.



¹H-NMR: 600 MHz, 280 K, 50 mM pH = 7,4 Phosphatpuffer/D₂O 9:1 (Komplexes Gemisch).

Borox-Lys-(Pro-Hyp-Gly)₇-NH₂ (61)

Borox-Lys-(Pro-Hyp-Gly)₇-NH₂ (61) wurde nach der *allgemeinen Vorschrift 1* in einer Ansatzgröße von 0,025 mm auf LL-Rink-Amid-Harz (B = 0,35 mmol/g, 100-200 mesh) synthetisiert. Die Abspaltung vom Harz erfolgte nach der *allgemeinen Vorschrift 4*. Nach Reinigung mittels semipräparativer RP-HPLC (2 → 20 B in 60 min bei 50 °C) wurde **Borox-Lys-(Pro-Hyp-Gly)₇-NH₂ (61)**, 12,7 mg, 26%) als farbloser Feststoff erhalten.

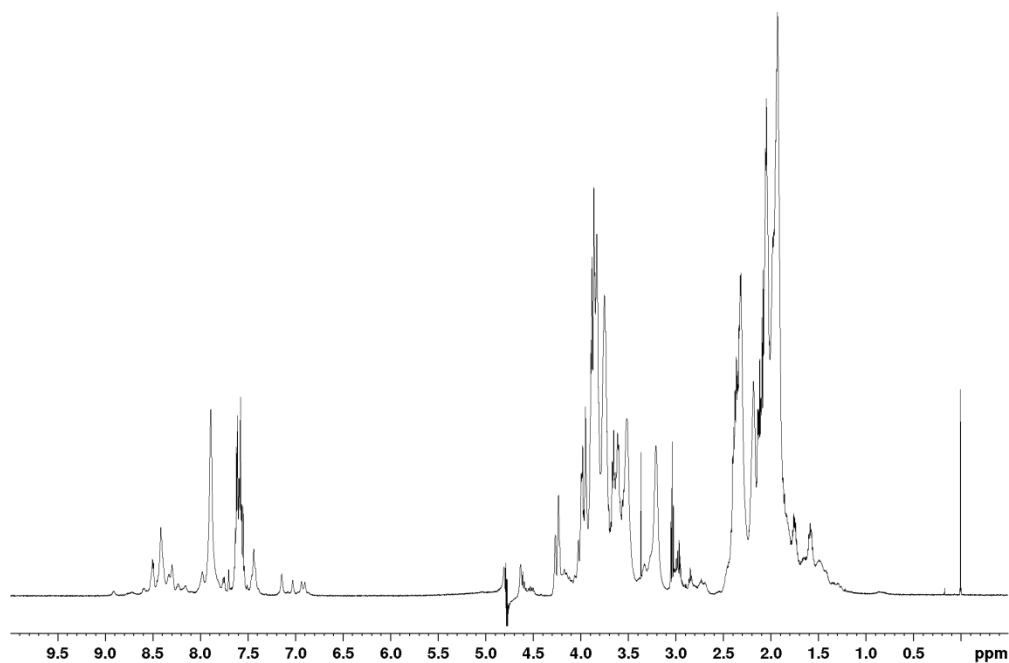
¹H-NMR: 600 MHz, 300 K, Phosphatpuffer/D₂O 9:1 (Tripelhelix): δ [ppm] = 1.43-2.14 (m, 102H, Pro-H_β, Pro-H_γ, Hyp-H_β, Lys-H_β, Lys-H_γ, Lys-H_δ), 2.15-2.42 (m, 42H, Pro-H_β, Hyp-H_β), 2.66-3.07 (m, 6H, Lys-H_ε), 3.13-3.40 (m, 21H, Pro-H_δ), 3.41-3.69 (m, 21H, Pro-H_δ), 3.70-4.00 (m, 84H, Gly-H_α, Hyp-H_δ), 4.60-4.67 (m, 21H, Hyp-H_γ), 4.73-4.87 (m, 51H, Pro-H_α, Hyp-H_α, Borox-CH₂, Lys-H_α), 6.84-7.19 (m, 3H, NH₂), 7.37-7.67 (m, 12H, H_{ar}, NH₂), 7.79-8.59 (m, 27H, Gly-NH, Lys-NH_α).

¹H-NMR: 500 MHz, 350 K, Phosphatpuffer /D₂O 9:1 (Einzelstrang): δ [ppm] = 1.50-1.63 (m, 2H, Lys-H_γ), 1.67-1.80 (m, 2H, Lys-H_δ), 1.81-2.10 (m, 23H, Pro-H_β, Pro-H_γ, Lys-H_β), 2.10-2.20 (m, 7H, Hyp-H_β), 2.26-2.55 (m, 14H, Hyp-H_β, Pro-H_β), 3.05 (t, ³J = 7.6 Hz, 2H, Lys-H_ε), 3.50-3.68 (m, 14H, Pro-H_δ), 3.68-4.01 (m, 22H, Gly-H_α, Hyp-H_δ, Lys-H_α), 4.19-4.29 (m, 7H, Gly-H_α), 4.55-4.93 (m, 23H, Hyp-H_α, Hyp-H_γ, Pro-H_α, Borox-CH₂), 7.58-7.67 (m, 3H, H_{ar}).

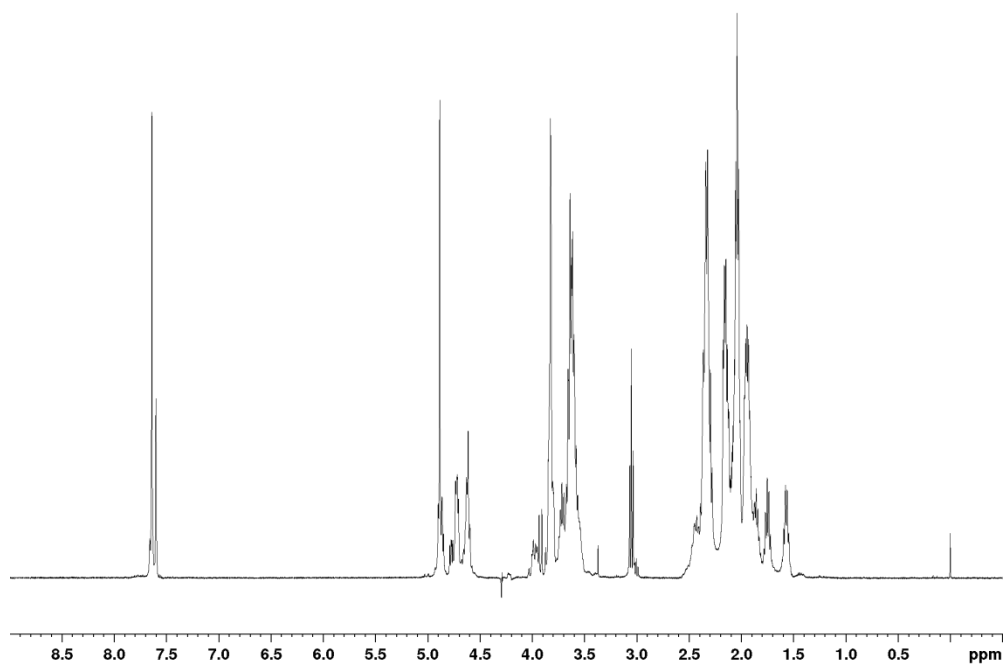
HRMS (ESI(+)): ber. für C₉₈H₁₃₉BN₂₄O₃₂H₂ [M+2H]²⁺: 1088.5120; gef.: 1088.5146.

HPLC: t_R = 16,3 min (Gradient: 2 → 20% B in 20 min bei 60 °C).

Experimenteller Teil



¹H-NMR: 600 MHz, 300 K, 50 mM pH = 7,4 Phosphatpuffer/D₂O 9:1 (Tripelhelix).



¹H-NMR: 500 MHz, 350 K, 50 mM pH = 7,4 Phosphatpuffer/D₂O 9:1 (Einzelstrang).

Borox-Gly-Lys-(Pro-Hyp-Gly)₇-NH₂ (62)

Borox-Gly-Lys-(Pro-Hyp-Gly)₇-NH₂ (62) wurde nach der *allgemeinen Vorschrift 1* in einer Ansatzgröße von 0,025 mm auf LL-Rink-Amid-Harz (B = 0,35 mmol/g, 100-200 mesh) synthetisiert. Die Abspaltung vom Harz erfolgte nach der *allgemeinen Vorschrift 4*. Nach Reinigung mittels semipräparativer RP-HPLC (2 → 20 B in 60 min bei 50 °C) wurde **Borox-Gly-Lys-(Pro-Hyp-Gly)₇-NH₂ (62)**, 11,2 mg, 24%) als farbloser Feststoff erhalten.

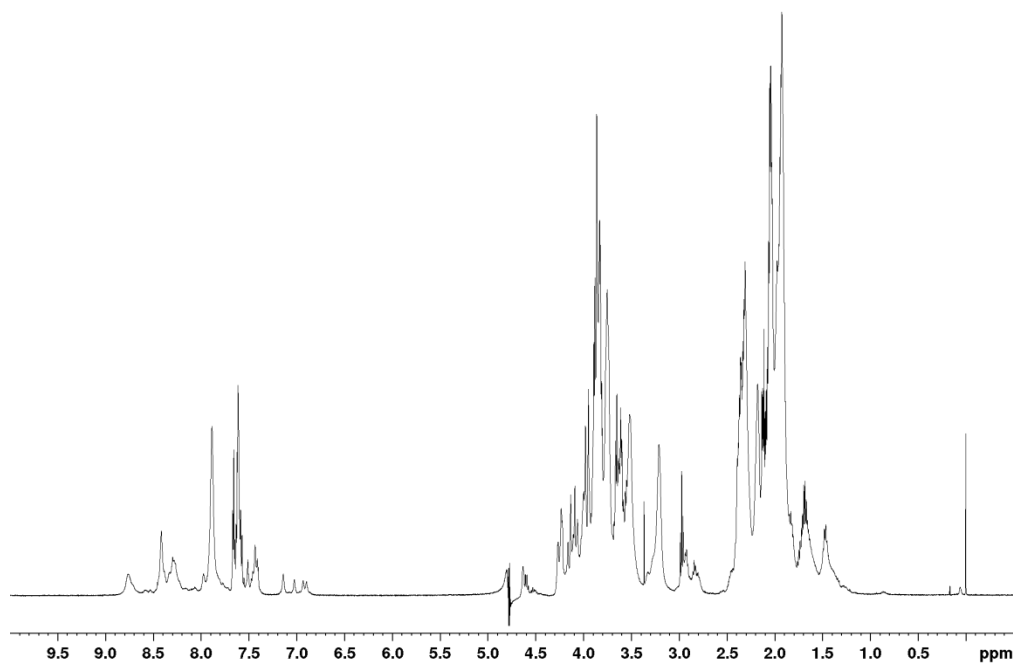
¹H-NMR: 600 MHz, 300 K, Phosphatpuffer/D₂O 9:1 (Tripelhelix): δ [ppm] = 1.38-1.53 (m, 6H, Lys-H_γ), 1.54-1.76 (m, 9H, Lys-H_β, Lys-H_δ), 1.80-2.14 (m, 87H, Pro-H_γ, Pro-H_β, Hyp-H_β, Lys-H_β), 2.13-2.41 (m, 42H, Pro-H_β, Hyp-H_β), 2.76-3.01 (m, 6H, Lys-H_ε), 3.11-3.40 (m, 21H, Pro-H_δ), 3.42-3.69 (m, 21H, Pro-H_δ), 3.69-4.29 (m, 90H, Gly-H_α, Hyp-H_δ), 4.46-4.68 (m, 24H, Hyp-H_γ, Lys-H_α), 4.73-4.82 (m, 48H, Pro-H_α, Hyp-H_α, Borox-CH₂), 6.82-7.22 (m, 3H, NH₂), 7.34-7.70 (m, 12H, H_{ar}, NH₂), 7.86-8.85 (m, 27H, Gly-NH, Lys-NH_α).

¹H-NMR: 500 MHz, 350 K, Phosphatpuffer /D₂O 9:1 (Einzelstrang): δ [ppm] = 1.40-1.53 (m, 2H, Lys-H_γ), 1.60-1.77 (m, 3H, Lys-H_β, Lys-H_δ), 1.78-2.09 (m, 22H, Pro-H_β, Pro-H_γ, Lys-H_β), 2.09-2.22 (m, 7H, Hyp-H_β), 2.23-2.57 (m, 14H, Hyp-H_β, Pro-H_β), 2.99 (t, ³J = 7.9 Hz, 2H, Lys-H_ε), 3.48-3.66 (m, 14H, Pro-H_δ), 3.66-4.03 (m, 23H, Gly-H_α, Hyp-H_δ, Lys-H_α), 4.18-4.25 (m, 8H, Gly-H_α), 4.51-4.94 (m, 23H, Hyp-H_α, Hyp-H_γ, Pro-H_α, Borox-CH₂), 7.54-7.84 (m, 3H, H_{ar}).

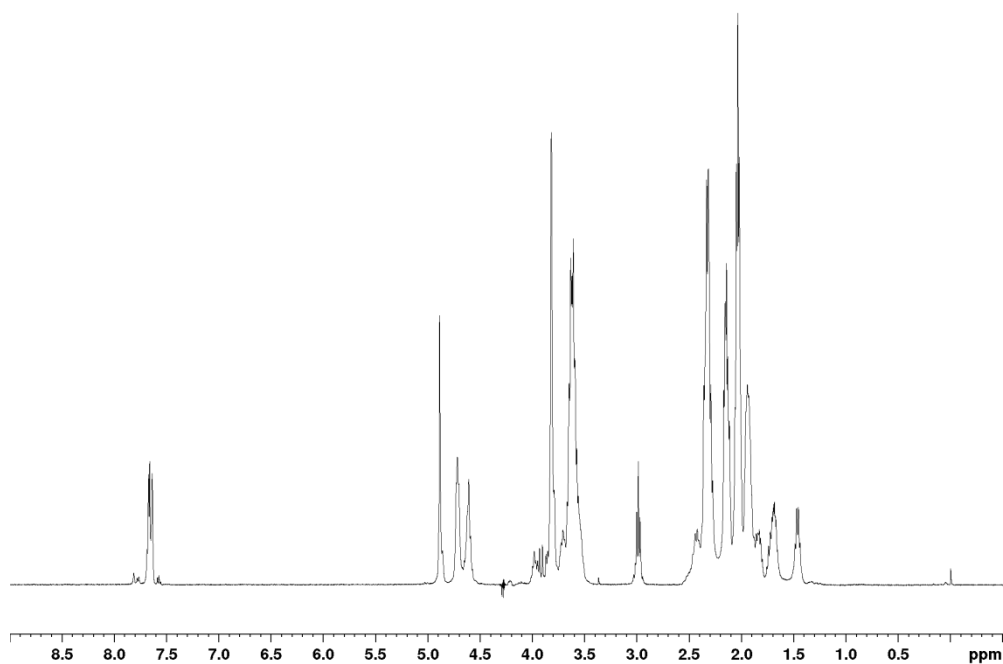
HRMS (ESI(+)): ber. für C₁₀₀H₁₄₂BN₂₅O₃₃H₂ [M+2H]²⁺: 1117.0228; gef.: 1117.0259.

HPLC: t_R = 15,5 min (Gradient: 2 → 20% B in 20 min bei 60 °C).

Experimenteller Teil

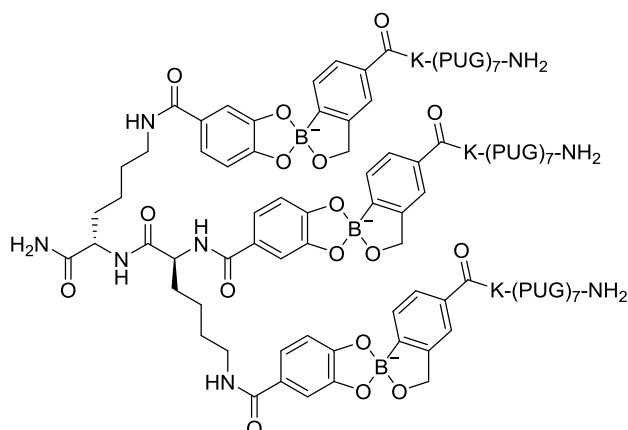


¹H-NMR: 600 MHz, 300 K, 50 mM pH = 7,4 Phosphatpuffer/D₂O 9:1 (Tripelhelix).



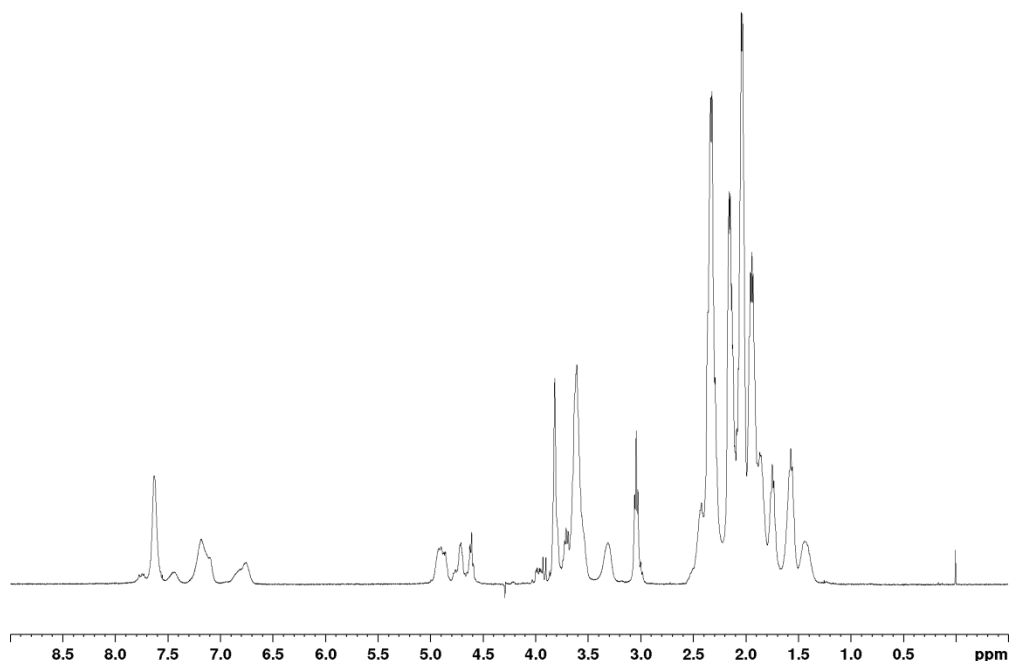
¹H-NMR: 500 MHz, 350 K, 50 mM pH = 7,4 Phosphatpuffer/D₂O 9:1 (Einzelstrang).

(Borox-Lys-(Pro-Hyp-Gly)₇-NH₂)₃ @ Cat-Lys(Cat)-Lys(Cat)-NH₂ (63)



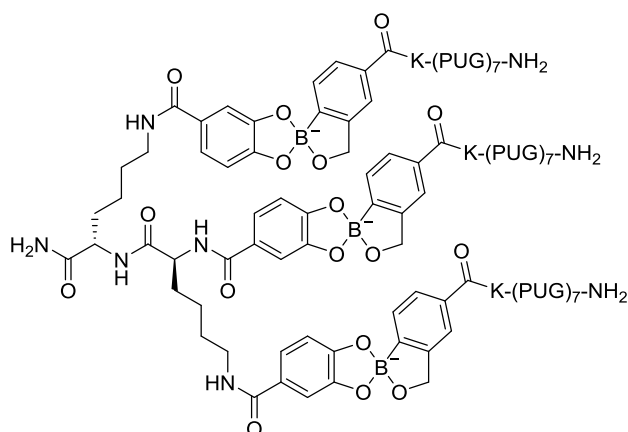
3,26 mg **Borox-Lys-(Pro-Hyp-Gly)₇-NH₂ (61)** und 341 µg **Cat-Lys(Cat)-Lys(Cat)-NH₂ (44)** wurden in Phosphatpuffer (pH = 7,4, 50 mM, 0,5 mL, 10% D₂O) gegeben. Dies resultierte in einer 3 mM Lösung von **61** (1 mM Lösung von **63**).

¹H-NMR: 500 MHz, 350 K, Phosphatpuffer/D₂O (Einzelstrang): δ [ppm] = 1.33-1.80 (m, 30H, Lys-H_β, Lys-H_γ, Lys-H_δ), 1.80-2.09 (m, 63H, Pro-H_γ, Pro-H_β), 2.09-2.22 (m, 21H, Hyp-H_β), 2.22-2.58 (m, 42H, Pro-H_β, Hyp-H_β), 2.96-3.10 (m, 6H, Lys-H_ε), 3.22-3.43 (m, 4H, Lys-H_ε), 3.49-3.76 (m, 78H, Gly-H_α, Pro-H_δ), 3.76-3.88 (m, 42H, Hyp-H_δ), 3.90-4.02 (m, 6H, Gly-H_α), 4.19-4.24 (m, 5H, Lys-H_α), 4.54-4.80 (m, 69H, Pro-H_α, Hyp-H_α, Hyp-H_γ), 4.80-5.03 (m, 6H, Borox-CH₂), 6.65-6.91 (m, 3H, Catechol-H_{ar}), 7.01-7.35 (m, 6H, Catechol-H_{ar}), 7.36-7.87 (m, 9H, Borox-H_{ar}).



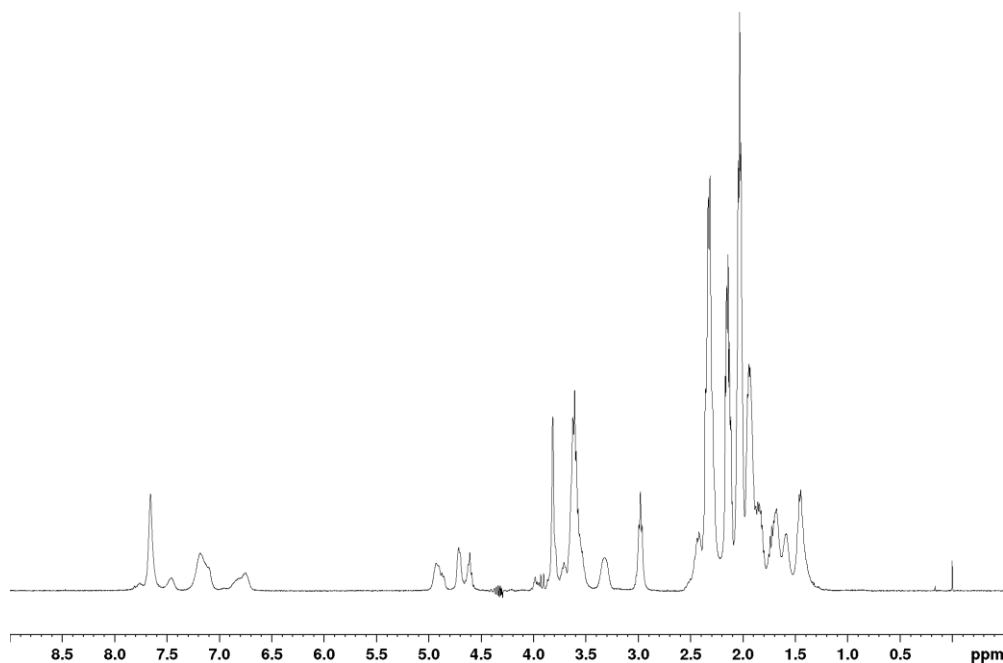
¹H-NMR: 500 MHz, 350 K, 50 mM pH = 7,4 Phosphatpuffer/D₂O 9:1 (Einzelstrang).

(Borox-Gly-Lys-(Pro-Hyp-Gly)₇-NH₂)₃ @ Cat-Lys(Cat)-Lys(Cat)-NH₂ (64)



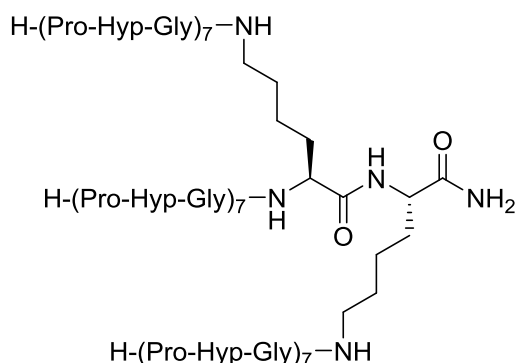
3,35 mg **Borox-Gly-Lys-(Pro-Hyp-Gly)₇-NH₂ (62)** und 341 µg **Cat-Lys(Cat)-Lys(Cat)-NH₂ (44)** wurden in Phosphatpuffer (pH = 7,4, 50 mM, 0,5 mL, 10% D₂O) gegeben. Dies resultierte in einer 3 mM Lösung von **62** (1 mM Lösung von **64**).

¹H-NMR: 500 MHz, 350 K, Phosphatpuffer/D₂O (Einzelstrang): δ [ppm] = 1.27-1.78 (m, 25H, Lys-H_β, Lys-H_γ, Lys-H_δ), 1.78-2.09 (m, 68H, Pro-H_γ, Pro-H_β, Lys-H_β), 2.09-2.21 (m, 21H, Hyp-H_β), 2.23-2.60 (m, 42H, Pro-H_β, Hyp-H_β), 2.89-3.05 (m, 6H, Lys-H_ε), 3.24-3.41 (m, 4H, Lys-H_ε), 3.50-3.75 (m, 78H, Gly-H_α, Pro-H_δ), 3.75-3.89 (m, 42H, Hyp-H_δ), 3.90-4.04 (m, 6H, Gly-H_α), 4.19-4.25 (m, 5H, Lys-H_α), 4.50-4.79 (m, 69H, Pro-H_α, Hyp-H_α, Hyp-H_γ), 4.80-5.03 (m, 6H, Borox-CH₂), 6.65-6.92 (m, 3H, Catechol-H_{ar}), 7.03-7.31 (m, 6H, Catechol-H_{ar}), 7.38-7.88 (m, 9H, Borox-H_{ar}).



¹H-NMR: 500 MHz, 350 K, 50 mM pH = 7,4 Phosphatpuffer/D₂O 9:1 (Einzelstrang).

H-(PUG)₇ auf Orn-Orn (66)



H-(PUG)₇ auf Orn-Orn (66) wurde nach der *allgemeinen Vorschrift 2* in einer Ansatzgröße von 0,025 mm auf LL-Rink-Amid-Harz (B = 0,35 mmol/g, 100-200 mesh) synthetisiert. Die Abspaltung vom Harz erfolgte nach der *allgemeinen Vorschrift 4*. **H-(PUG)₇ auf Orn-Orn (66)**, 52,6 mg) als farbloser Feststoff erhalten und ohne weitere

Reinigung verwendet.

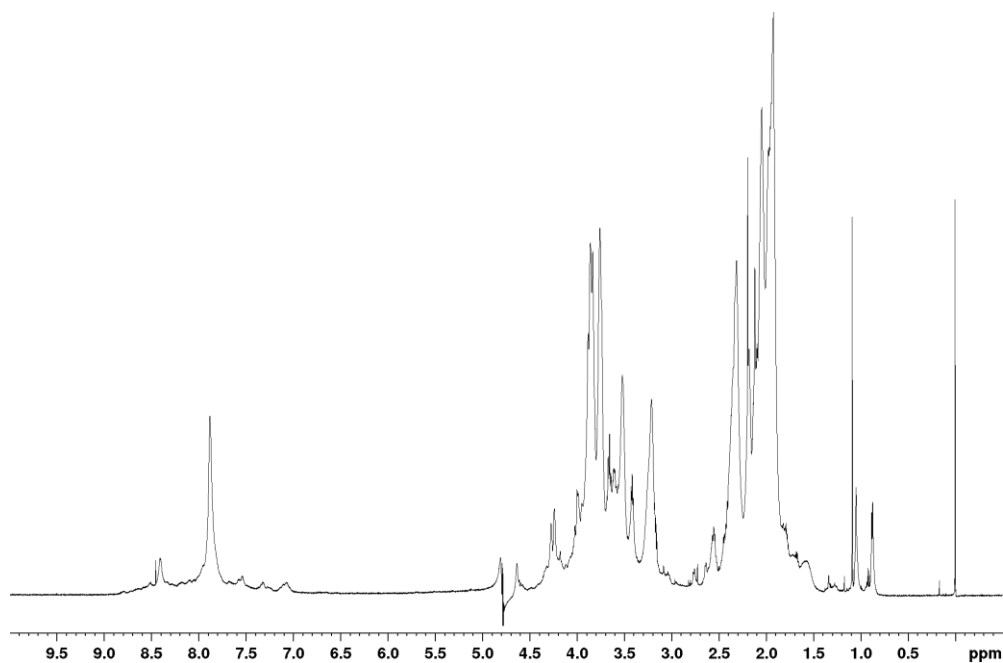
¹H-NMR: 600 MHz, 300 K, Phosphatpuffer/D₂O 9:1 (Tripelhelix): δ [ppm] = 1.45-1.75 (m, 6H, Orn-H_β, Orn-H_γ), 1.75-2.14 (m, 86H, Pro-H_γ, Pro-H_β, Hyp-H_β, Orn-H_β), 2.15-2.43 (m, 42H, Pro-H_β, Hyp-H_β), 3.11-3.33 (m, 21H, Pro-H_δ), 3.38-3.68 (m, 25H, Pro-H_δ, Orn-H_δ), 3.69-4.31 (m, 84H, Gly-H_α, Hyp-H_δ), 4.57-4.68 (m, 23H, Hyp-H_γ, Orn-H_α), 4.73-4.86 (m, 42H, Pro-H_α, Hyp-H_α), 6.99-7.40 (m, 1H, NH₂) 7.79-8.85 (m, 26H, Gly-NH, Orn-NH_α, Orn-NH_δ, NH₂).

¹H-NMR: 500 MHz, 350 K, Phosphatpuffer /D₂O 9:1 (Einzelstrang): δ [ppm] = 1.45-1.76 (m, 6H, Orn-H_β, Orn-H_γ), 1.78-2.08 (m, 65H, Pro-H_β, Pro-H_γ, Orn-H_β), 2.08-2.20 (m, 21H, Hyp-H_β), 2.23-2.56 (m, 42H, Hyp-H_β, Pro-H_β), 3.12-3.43 (m, 4H, Orn-H_δ), 3.48-3.68 (m, 42H, Pro-H_δ), 3.68-4.01 (m, 86H, Gly-H_α, Hyp-H_δ, Orn-H_α), 4.48-4.93 (m, 63H, Hyp-H_α, Hyp-H_γ, Pro-H_α).

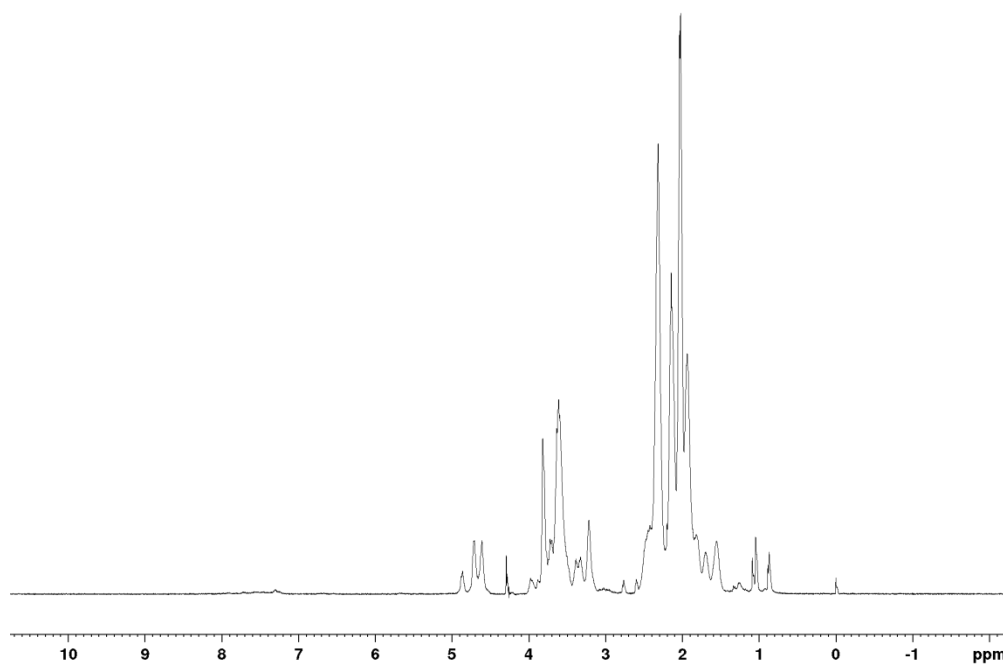
HRMS (ESI(+)): ber. für C₂₆₂H₃₇₇N₆₈O₈₆Na₃H₂ [M+3Na+2H]⁵⁺: 1185.1425 gef.: 1185.1455.

HPLC: t_R = 3,5 min (Gradient: 10 → 90% B in 8 min bei 60 °C).

Experimenteller Teil

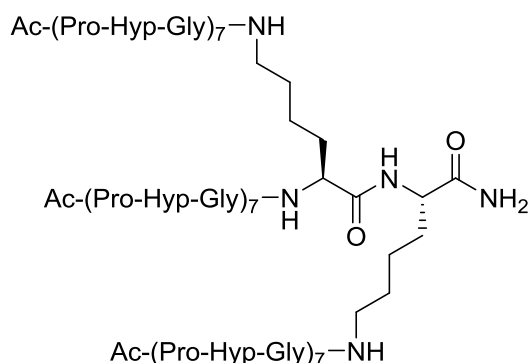


^1H -NMR: 600 MHz, 300 K, 50 mm pH = 7,4 Phosphatpuffer/D₂O 9:1 (Tripelhelix).



^1H -NMR: 500 MHz, 350 K, 50 mm pH = 7,4 Phosphatpuffer/D₂O 9:1 (Einzelstrang).

Ac-(PUG)₇ auf Orn-Orn (67)



Ac-(PUG)₇ auf Orn-Orn (67) wurde nach der *allgemeinen Vorschrift 2* in einer Ansatzgröße von 0,025 mm auf LL-Rink-Amid-Harz (B = 0,35 mmol/g, 100-200 mesh) synthetisiert. Die Abspaltung vom Harz erfolgte nach der *allgemeinen Vorschrift 4*. **Ac-(PUG)₇ auf Orn-Orn (67)**, 49,2 mg) als farbloser Feststoff erhalten und ohne weitere

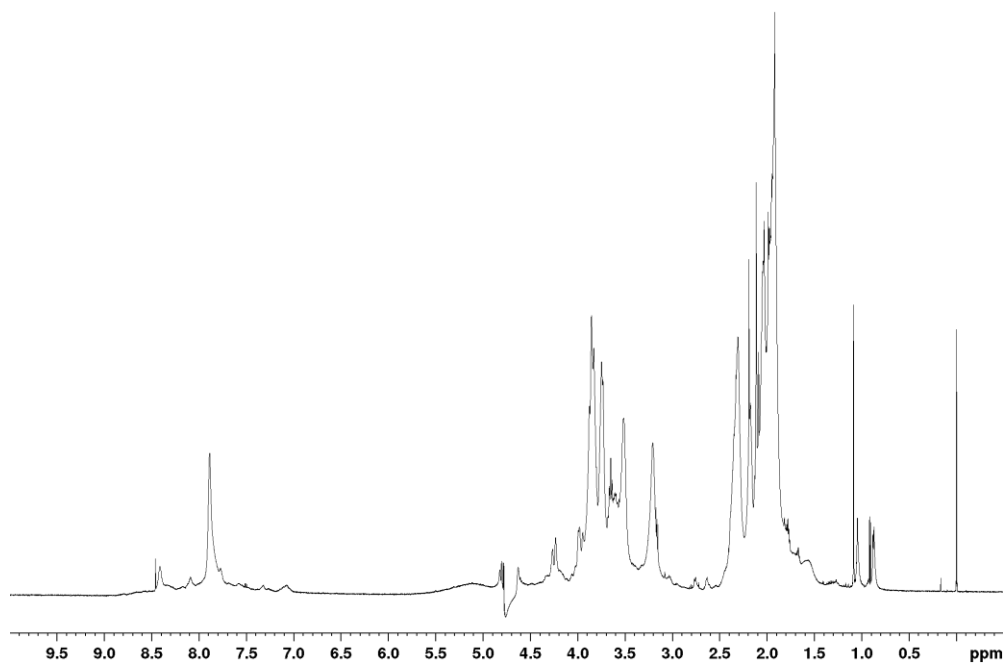
Reinigung verwendet.

¹H-NMR: 600 MHz, 300 K, Phosphatpuffer/D₂O 9:1 (Tripelhelix): δ [ppm] = 1.45-1.74 (m, 6H, Orn-H_β, Orn-H_γ), 1.75-2.13 (m, 95H, Pro-H_γ, Pro-H_β, Hyp-H_β, Orn-H_β, Ac), 2.15-2.47 (m, 42H, Pro-H_β, Hyp-H_β), 3.15-3.30 (m, 21H, Pro-H_δ), 3.45-3.68 (m, 25H, Pro-H_δ, Orn-H_δ), 3.70-3.94 (m, 84H, Gly-H_α, Hyp-H_δ), 4.55-4.65 (m, 23H, Hyp-H_γ, Lys-H_α), 4.73-4.86 (m, 42H, Pro-H_α, Hyp-H_α), 7.00-7.38 (m, 1H, NH₂) 7.77-8.38 (m, 26H, Gly-NH, Lys-NH_α, Orn-NH_δ, NH₂).

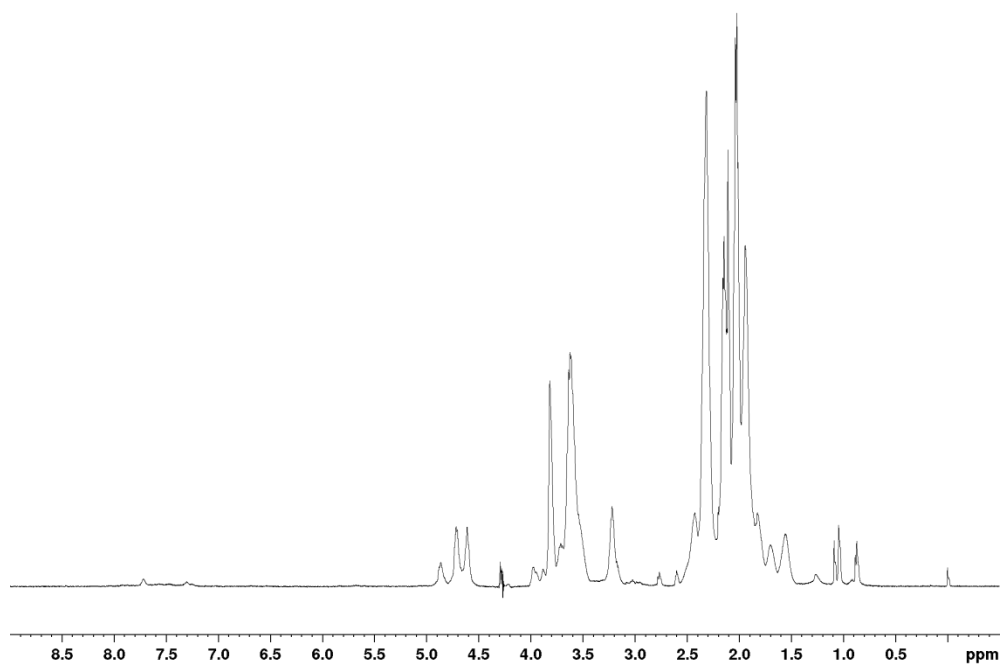
¹H-NMR: 500 MHz, 350 K, Phosphatpuffer /D₂O 9:1 (Einzelstrang): δ [ppm] = 1.45-1.75 (m, 6H, Orn-H_β, Orn-H_γ), 1.78-2.07 (m, 65H, Pro-H_β, Pro-H_γ, Orn-H_β), 2.07-2.22 (m, 30H, Hyp-H_β, Ac), 2.24-2.55 (m, 42H, Hyp-H_β, Pro-H_β), 3.44-3.68 (m, 46H, Pro-H_δ, Orn-H_δ), 3.68-4.02 (m, 86H, Gly-H_α, Hyp-H_δ, Orn-H_α), 4.50-4.93 (m, 63H, Hyp-H_α, Hyp-H_γ, Pro-H_α).

HPLC: t_R = 3,7 min (Gradient: 10 → 90% B in 8 min bei 60 °C).

Experimenteller Teil



^1H -NMR: 600 MHz, 300 K, 50 mM pH = 7,4 Phosphatpuffer/ D_2O 9:1 (Tripelhelix).



^1H -NMR: 500 MHz, 350 K, 50 mM pH = 7,4 Phosphatpuffer/ D_2O 9:1 (Einzelstrang).

Literaturverzeichnis

- [1] J. Brinckmann, *Top. Curr. Chem.* **2005**, 247, 1–6.
- [2] M. D. Shoulders, R. T. Raines, *Annu. Rev. Biochem.* **2009**, 78, 929–958.
- [3] P. Szpak, *J. Archaeol. Sci.* **2011**, 38, 3358–3372.
- [4] J. Engel, H. P. Bächinger, *Top. Curr. Chem.* **2005**, 247, 7–33.
- [5] J. E. Baldwin, R. A. Field, C. C. Lawrence, V. Lee, J. K. Robinson, C. J. Schofield, *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 4649–4652.
- [6] J. E. Baldwin, R. A. Field, C. C. Lawrence, K. D. Merritt, C. J. Schofield, *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 7489–7492.
- [7] L. Kukkola, R. Hieta, K. I. Kivirikko, J. Myllyharju, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 47685–47693.
- [8] G. P. Riley, V. Curry, J. DeGroot, B. Van El, N. Verzijl, B. L. Hazleman, R. A. Bank, *Matrix Biol.* **2002**, 21, 185–195.
- [9] E. P. Zimina, A. Fritsch, B. Schermer, A. Y. Bakulina, M. Bashkurov, T. Benzing, L. Bruckner-Tuderman, *J. Biol. Chem.* **2007**, 282, 22737–22746.
- [10] G. Yalak, Y. H. Ehrlich, B. R. Olsen, *J. Transl. Med.* **2014**, 12, 1–6.
- [11] B. Schegg, A. J. Hulsmeier, C. Rutschmann, C. Maag, T. Hennet, *Mol. Cell. Biol.* **2009**, 29, 943–952.
- [12] H. Rosenberg, J. B. Modrak, J. M. Hassing, W. A. Al-Turk, S. J. Stohs, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1979**, 91, 498–501.
- [13] G. Veit, B. Kobbe, D. R. Keene, M. Paulsson, M. Koch, R. Wagener, *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 3494–3504.
- [14] J. Myllyharju, K. I. Kivirikko, *Trends Genet.* **2004**, 20, 33–43.
- [15] K. I. Kivirikko, R. Myllylä, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1985**, 460, 187–201.
- [16] S. H. Mclaughlin, N. J. Bulleid, *Matrix Biol.* **1998**, 16, 369–377.

- [17] D. J. S. Hulmes, J. C. Jesior, A. Miller, C. Berthet-Colominas, C. Wolff, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1981**, 78, 3567–3571.
- [18] S. M. Sweeney, C. A. Guy, G. B. Fields, J. D. San Antonio, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, 95, 7275–7280.
- [19] S. P. Boudko, J. Engel, K. Okuyama, K. Mizuno, H. P. Bächinger, M. A. Schumacher, *J. Biol. Chem.* **2008**, 283, 32580–32589.
- [20] R. Z. Kramer, J. Bella, P. Mayville, B. Brodsky, H. M. Berman, *Nat. Struct. Biol.* **1999**, 6, 454–457.
- [21] E. R. Mejía, J. D. Ospina, L. Osorno, M. A. Márquez, A. L. Morales, *Cell* **2000**, 101, 47–56.
- [22] J. Myllyharju, K. I. Kivirikko, *Ann. Med.* **2001**, 33, 7–21.
- [23] G. Melacini, Y. Feng, M. Goodman, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 10359–10364.
- [24] C. G. Long, E. Braswell, D. Zhu, J. Apigo, J. Baum, B. B. J., *Biochemistry* **1993**, 32, 11688–11695.
- [25] J. Egli, R. S. Erdmann, P. J. Schmidt, H. Wennemers, *Chem. Commun.* **2017**, 53, 11036–11039.
- [26] A. V. Persikov, J. A. M. Ramshaw, A. Kirkpatrick, B. Brodsky, *Biochemistry* **2000**, 39, 14960–14967.
- [27] J. Egli, C. Siebler, B. Maryasin, R. S. Erdmann, C. Bergande, C. Ochsenfeld, H. Wennemers, *Chem. Eur. J.* **2017**, 23, 7938–7944.
- [28] R. S. Erdmann, H. Wennemers, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 17117–17124.
- [29] A. A. Jalan, B. Demeler, J. D. Hartgerink, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 6014–6017.
- [30] E. Benedetti, B. Di Blasio, V. Pavone, C. Pedone, A. Felix, M. Goodman, *Biopolymers* **1981**, 20, 283–302.
- [31] A. A. Jalan, K. A. Jochim, J. D. Hartgerink, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136,

- 7535–7538.
- [32] N. Dai, F. A. Etzkorn, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 13728–13732.
- [33] E. A. Kersteen, R. T. Raines, *Biopolymers* **2001**, 59, 24–28.
- [34] M. Schwarz, D. Poland, *Biopolymers* **1974**, 13, 687–701.
- [35] T. Luo, K. L. Kiick, *Eur. Polym. J.* **2013**, 49, 2998–3009.
- [36] K. J. Coyne, X. X. Qin, J. H. Waite, *Science* **1997**, 277, 1830–1832.
- [37] J. A. M. Ramshaw, N. K. Shah, B. Brodsky, *J. Struct. Biol.* **1998**, 122, 86–91.
- [38] C. Triple-helix, V. C. Chan, J. A. M. Ramshaw, A. Kirkpatrick, K. Beck, B. Brodsky, *Biochemistry* **1997**, 272, 31441–31446.
- [39] C. L. Jenkins, M. M. Vasbinder, S. J. Miller, R. T. Raines, *Org. Lett.* **2005**, 7, 2619–2622.
- [40] O. P. Boryskina, T. V. Bolbukh, M. A. Semenov, A. I. Gasan, V. Y. Maleev, *J. Mol. Struct.* **2007**, 827, 1–10.
- [41] A. J. Kasznel, Y. Zhang, Y. Hai, D. M. Chenoweth, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, 139, 9427–9430.
- [42] Y. Zhang, M. Herling, D. M. Chenoweth, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, 138, 9751–9754.
- [43] B. T. Shireman, M. J. Miller, M. Jonas, O. Wiest, *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 6046–6056.
- [44] J. F. Brandts, H. R. Halvorson, M. Brennan, *Biochemistry* **1975**, 14, 4953–4963.
- [45] R. Jaenicke, *Angew. Chemie Int. Ed.* **1984**, 23, 395–413.
- [46] H. P. Bächinger, *J. Biol. Chem.* **1987**, 262, 17144–17148.
- [47] B. Steinmann, P. Bruckner, A. Superti-Furga, *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 1299–1303.
- [48] D. J. Cram, *Science* **1988**, 240, 760–767.

- [49] N. Dai, X. J. Wang, F. A. Etzkorn, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5396–5397.
- [50] R. A. Berg, D. J. Prockop, *Biochim. Biophys. Acta* **1973**, *52*, 115–120.
- [51] S. Sakakibara, K. Inouye, K. Shudo, Y. Kishida, Y. Kobayashi, D. J. Prockop, *Biochim. Biophys. Acta* **1973**, *303*, 198–202.
- [52] T. V. Burjanadze, E. L. Kisiriya, *Biopolymers* **1982**, *21*, 1695–1701.
- [53] F. W. Kotch, I. A. Guzei, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 2952–2953.
- [54] M. L. DeRider, S. J. Wilkens, M. J. Waddell, L. E. Bretscher, F. Weinhold, R. T. Raines, J. L. Markley, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2497–2505.
- [55] L. E. Bretscher, C. L. Jenkins, K. M. Taylor, M. L. Derider, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 777–778.
- [56] R. S. Erdmann, H. Wennemers, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2011**, *50*, 6835–6838.
- [57] W. Y. Chow, D. Bihan, C. J. Forman, D. A. Slatter, D. G. Reid, D. J. Wales, R. W. Farndale, M. J. Duer, *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 1–11.
- [58] C. Siebler, R. S. Erdmann, H. Wennemers, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2014**, *53*, 10340–10344.
- [59] R. S. Erdmann, H. Wennemers, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 13957–13959.
- [60] D. Barth, A. G. Milbradt, C. Renner, L. Moroder, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 79–86.
- [61] C. M. Taylor, R. Hardré, P. J. B. Edwards, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 1306–1315.
- [62] C. L. Jenkins, R. T. Raines, *Nat. Prod. Rep.* **2002**, *19*, 49–59.
- [63] A. J. Ellison, B. Vanveller, R. T. Raines, *Biopolymers* **2015**, *104*, 674–681.
- [64] A. M. Acevedo-Jake, A. A. Jalan, J. D. Hartgerink, *Biomacromolecules* **2015**, *16*, 145–155.

- [65] M. Goodman, Y. Feng, G. Melacini, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 10725–10732.
- [66] R. Consonni, L. Zetta, R. Longhi, L. Toma, G. Zanaboni, R. Tenni, *Biopolymers* **2000**, 53, 99–111.
- [67] M. H. Li, P. Fan, B. Brodsky, J. Baum, *Biochemistry* **1993**, 32, 7377–7387.
- [68] J. Baum, B. Brodsky, *Fold. Des.* **1997**, 2, 53–60.
- [69] B. Madhan, J. Xiao, G. Thiagarajan, J. Baum, B. Brodsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 13520–13521.
- [70] J. A. Hodgest, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 9262–9263.
- [71] A. V. Persikov, J. A. M. Ramshaw, A. Kirkpatrick, B. Brodsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 11500–11501.
- [72] S. K. Holmgren, L. E. Bretscher, K. M. Taylor, R. T. Raines, *Chem. Biol.* **1999**, 2, 63–70.
- [73] S. D. Mooney, P. A. Kollman, T. E. Klein, *Biopolymers* **2002**, 64, 63–71.
- [74] K. Inouy, S. Sakakibara, D. J. Prockop, *BBA - Protein Struct.* **1976**, 420, 133–141.
- [75] M. D. Shoulders, F. W. Kotch, A. Choudhary, I. A. Guzei, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 10857–10865.
- [76] M. D. Shoulders, J. A. Hodges, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 8112–8113.
- [77] M. Doi, Y. Nishi, S. Uchiyama, Y. Nishiuchi, T. Nakazawa, T. Ohkubo, Y. Kobayashi, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 9922–9923.
- [78] J. A. Hodges, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 15923–15932.
- [79] K. Inouye, Y. Kobayashi, Y. Kyogoku, Y. Kishida, S. Sakakibara, D. J. Prockop, *Arch. Biochem. Biophys.* **1982**, 219, 198–203.
- [80] A. V Persikov, J. A. M. Ramshaw, B. Brodsky, *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 19343–19349.

- [81] N. K. Shah, B. Brodsky, A. Kirkpatrick, J. A. M. Ramshaw, *Biopolymers* **1999**, 49, 297–302.
- [82] Y. Zhang, R. M. Malamakal, D. M. Chenoweth, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2015**, 54, 10826–10832.
- [83] C. L. Jenkins, L. E. Bretscher, I. A. Guzei, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 6422–6427.
- [84] N. B. Hentzen, L. E. J. Smeenk, J. Witek, S. Riniker, H. Wennemers, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, 139, 12815–12820.
- [85] R. S. Erdmann, H. Wennemers, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, 21, 3565–3568.
- [86] J. Kwak, A. De Capua, E. Locardi, M. Goodman, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 14085–14091.
- [87] F. Weiher, M. Schatz, C. Steinem, A. Geyer, *Biomacromolecules* **2013**, 14, 683–687.
- [88] Y. Tanaka, K. Suzuki, T. Tanaka, *J. Pept. Res.* **2010**, 51, 413–419.
- [89] H. Hojo, Y. Akamatsu, K. Yamauchi, M. Kinoshita, S. Miki, Y. Nakamura, *Tetrahedron* **1997**, 53, 14263–14274.
- [90] F. W. Kotch, R. T. Raines, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, 103, 3028–3033.
- [91] D. Eyre, *Annu. Rev. Biochem.* **1984**, 53, 717–748.
- [92] M. Goodman, Y. Feng, G. Melacini, J. P. Taulane, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 5156–5157.
- [93] C. Byrne, P. A. McEwan, J. Emsley, P. M. Fischer, W. C. Chan, *Chem. Commun.* **2011**, 47, 2589–2591.
- [94] H. Ehrlich, M. Wysokowski, S. Zółtowska-Aksamitowska, I. Petrenko, T. Jesionowski, *Mar. Drugs* **2018**, 16, 1–21.
- [95] H. Ehrlich *et al.*, *Nat. Chem.* **2010**, 2, 1084–1088.
- [96] S. Heinemann, C. Heinemann, H. Ehrlich, M. Meyer, H. Baltzer, H. Worch, T.

- Hanke, *Adv. Eng. Mater.* **2007**, 9, 1061–1068.
- [97] W. Roth, K. Heppenheimer, E. R. Heidemann, *Die Makromol. Chemie* **1979**, 180, 905–917.
- [98] S. Boudko, S. Frank, R. A. Kammerer, J. Stetefeld, T. Schulthess, R. Landwehr, A. Lustig, H. P. Bächinger, J. Engel, *J. Mol. Biol.* **2002**, 317, 459–470.
- [99] I. C. Li, S. A. H. Hulgán, D. R. Walker, R. W. Farndale, J. D. Hartgerink, A. A. Jalan, *Org. Lett.* **2019**, 5480–5484.
- [100] A. A. Jalan, B. Demeler, J. D. Hartgerink, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 6014–6017.
- [101] V. Gauba, J. D. Hartgerink, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 2683–2690.
- [102] A. S. Parmar, F. Xu, D. H. Pike, S. V. Belure, N. F. Hasan, K. E. Drzewiecki, D. I. Shreiber, V. Nanda, *Biochemistry* **2015**, 54, 4987–4997.
- [103] L. T. Lebrun, S. Banerjee, B. D. O'Rourke, M. A. Case, *Biopolymers* **2011**, 95, 792–800.
- [104] N. Miyaura, K. Yamada, A. Suzuki, *Tetrahedron Lett.* **1979**, 20, 3437–3440.
- [105] N. Miyaura, A. Suzuki, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1979**, 866–867.
- [106] S. Eagon, J. Kim, K. Yan, D. Haddenham, B. Singaram, *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48, 9025–9029.
- [107] S. Sakuma, M. Sakai, R. Itooka, N. Miyaura, *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 5951–5955.
- [108] L. S. Liebeskind, J. Srogl, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 11260–11261.
- [109] T. S. Mei, E. W. Werner, A. J. Burckle, M. S. Sigman, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 6830–6833.
- [110] S. J. Coutts, T. A. Kelly, R. J. Snow, C. A. Kennedy, R. W. Barton, J. Adams, D. A. Krolikowski, D. M. Freeman, S. J. Campbell, J. F. Ksiazek, W. W. Bachovchin, *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 2087–2094.

- [111] J. Adams, M. Behnke, S. Chen, A. A. Cruickshank, L. R. Dick, L. Grenier, J. M. Klunder, Y.-T. Ma, L. Plamondon, R. L. Stein, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, 8, 333–338.
- [112] F. Morandi, E. Caselli, S. Morandi, P. J. Focia, J. Blázquez, B. K. Shoichet, F. Prati, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 685–695.
- [113] G. Cathepsin, P. Boronic, C. A. Kettner, A. B. Shenvi, *J. Biol. Chem.* **1984**, 259, 15106–15114.
- [114] J. M. Fevig, M. M. Abelman, D. R. Brittelli, C. A. Kettner, R. M. Knabb, P. C. Weber, *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **1996**, 6, 295–300.
- [115] C. Kettner, L. Mersinger, R. Knabb, *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 18289–18297.
- [116] M. L. Wolfrom, J. Solms, *J. Org. Chem.* **1956**, 21, 815–816.
- [117] J. P. Lorand, J. O. Edwards, *J. Org. Chem.* **1959**, 24, 769–774.
- [118] H. G. Kuivila, A. H. Keough, E. J. Soboczinski, *J. Org. Chem.* **1954**, 19, 780–783.
- [119] T. D. James, K. R. A. Samankumara Sandanayake, S. Shinkai, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, 35, 1910–1922.
- [120] X. Wu, Z. Li, X. X. Chen, J. S. Fossey, T. D. James, Y. B. Jiang, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42, 8032–8048.
- [121] R. Nishiyabu, Y. Kubo, T. D. James, J. S. Fossey, *Chem. Commun.* **2011**, 47, 1106–1123.
- [122] K. Torrsell, *Ark. Kemi.* **1957**, 10, 507.
- [123] W. M. Cummings, C. H. Cox, H. R. Snyder, *J. Org. Chem.* **1969**, 34, 1669–1674.
- [124] V. V. Zhdankin, P. J. Persichini III, L. Zhang, S. Fix, P. Kiprof, *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 6705–6708.
- [125] J. W. Tomsho, A. Pal, D. G. Hall, S. J. Benkovic, *ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, 3, 48–52.

- [126] J. W. Tomsho, S. J. Benkovic, *J. Org. Chem.* **2012**, 77, 11200–11209.
- [127] A. Adamczyk-Woźniak, M. K. Cyrański, A. Zubrowska, A. Sporzyński, *J. Organomet. Chem.* **2009**, 694, 3533–3541.
- [128] Y. Furikado, T. Nagahata, T. Okamoto, T. Sugaya, S. Iwatsuki, M. Inamo, H. D. Takagi, A. Odani, K. Ishihara, *Chem. Eur. J.* **2014**, 20, 13194–13202.
- [129] M. Bérubé, M. Dowlut, D. G. Hall, *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 6471–6479.
- [130] A. Pal, M. Bérubé, D. G. Hall, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 1492–1495.
- [131] D. Claes, E. Memmel, M. Holzapfel, J. Seibel, W. Maison, *ChemBioChem* **2014**, 15, 2450–2457.
- [132] D. Dechtrirat, N. Gajovic-Eichelmann, F. Wojcik, L. Hartmann, F. F. Bier, F. W. Scheller, *Biosens. Bioelectron.* **2014**, 58, 1–8.
- [133] M. Dowlut, D. G. Hall, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 4226–4227.
- [134] G. A. Ellis, M. J. Palte, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 3631–3634.
- [135] J. I. Jay, B. E. Lai, D. G. Myszka, A. Mahalingam, K. Langheinrich, D. F. Katz, P. F. Kiser, *Mol. Pharm.* **2010**, 7, 116–129.
- [136] A. Mahalingam, A. R. Geonnotti, J. Balzarini, P. F. Kiser, *Mol. Pharm.* **2011**, 8, 2465–2475.
- [137] T. Akama, S. J. Baker, Y. K. Zhang, V. Hernandez, H. Zhou, V. Sanders, Y. Freund, R. Kimura, K. R. Maples, J. J. Plattner, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 19, 2129–2132.
- [138] M. A. Alam, K. Arora, S. Gurrapu, S. K. Jonnalagadda, G. L. Nelson, P. Kiprof, S. C. Jonnalagadda, V. R. Mereddy, *Tetrahedron* **2016**, 72, 3795–3801.
- [139] S. J. Baker, Y. K. Zhang, T. Akama, A. Lau, H. Zhou, V. Hernandez, W. Mao, M. R. K. Alley, V. Sanders, J. J. Plattner, *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 4447–4450.
- [140] Y. K. Zhang, J. J. Plattner, T. Akama, S. J. Baker, V. S. Hernandez, V. Sanders, Y. Freund, R. Kimura, W. Bu, K. M. Hold, X. S. Lu, *Bioorg. Med.*

- Chem. Lett.* **2010**, 20, 2270–2274.
- [141] Y. Kotsuchibashi, M. Ebara, *Polymers (Basel)*. **2016**, 8, 41.
- [142] Y. Chen, Z. Tan, W. Wang, Y. Y. Peng, R. Narain, *Biomacromolecules* **2019**, 20, 1028–1035.
- [143] Y. Kotsuchibashi, M. Ebara, T. Sato, Y. Wang, R. Rajender, D. G. Hall, R. Narain, T. Aoyagi, *J. Phys. Chem. B* **2015**, 119, 2323–2329.
- [144] Y. Kotsuchibashi, R. V. C. Agustin, J. Y. Lu, D. G. Hall, R. Narain, *ACS Macro Lett.* **2013**, 2, 260–264.
- [145] L. Rowe, G. El Khoury, C. R. Lowe, *J. Mol. Recognit.* **2016**, 29, 232–238.
- [146] H. Li, H. Wang, Y. Liu, Z. Liu, *Chem. Commun.* **2012**, 48, 4115–4117.
- [147] M. Hutin, G. Bernardinelli, J. R. Nitschke, *Chem. - A Eur. J.* **2008**, 14, 4585–4593.
- [148] A. M. Kelly, Y. Pérez-Fuertes, S. Arimori, S. D. Bull, T. D. James, *Org. Lett.* **2006**, 8, 1971–1974.
- [149] N. Iwasawa, H. Takahagi, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 7754–7755.
- [150] H. Takahagi, N. Iwasawa, *Chem. - A Eur. J.* **2010**, 16, 13680–13688.
- [151] S. Ito, H. Takata, K. Ono, N. Iwasawa, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2013**, 52, 11045–11048.
- [152] K. Tamaki, A. Ishigami, Y. Tanaka, M. Yamanaka, K. Kobayashi, *Chem. - A Eur. J.* **2015**, 21, 13714–13722.
- [153] N. Nishimura, K. Yoza, K. Kobayashi, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 777–790.
- [154] N. Nishimura, K. Kobayashi, *J. Org. Chem.* **2010**, 75, 6079–6085.
- [155] M. A. Martínez-Aguirre, J. M. Del Campo, S. Escalante-Tovar, A. K. Yatsimirsky, *RSC Adv.* **2015**, 5, 30075–30083.
- [156] A. Wuttke, S. N. Fischer, A. Nebel, M. Marsch, A. Geyer, *Org. Biomol. Chem.* **2016**, 14, 5032–5048.

- [157] A. Wuttke, A. Geyer, *J. Pept. Sci.* **2017**, 23, 549–555.
- [158] P. Saá, J. Castilla, C. Soto, *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 35245–35252.
- [159] E. Biasini, M. E. Seegulam, B. N. Patti, L. Solforosi, A. Z. Medrano, H. M. Christensen, A. Senatore, R. Chiesa, R. A. Williamson, D. A. Harris, *J. Neurochem.* **2008**, 105, 2190–2204.
- [160] L. Redecke, M. von Bergen, J. Clos, P. V. Konarev, D. I. Svergun, U. E. A. Fittschen, J. A. C. Broekaert, O. Bruns, D. Georgieva, E. Mandelkow, N. Genov, C. Betzel, *J. Struct. Biol.* **2007**, 157, 308–320.
- [161] D. J. Belton, O. Deschaume, C. C. Perry, *FEBS J.* **2012**, 279, 1710–1720.
- [162] C. Allègre, G. Manhès, É. Lewin, *Earth Planet. Sci. Lett.* **2001**, 185, 49–69.
- [163] E. Bäuerlein, *Angew. Chemie* **2003**, 115, 636–664.
- [164] S. Weiner, L. Addadi, *J. Mater. Chem.* **1997**, 7, 689–702.
- [165] M. Sumper, E. Brunner, *Adv. Funct. Mater.* **2006**, 16, 17–26.
- [166] M. Sumper, E. Brunner, *ChemBioChem* **2008**, 9, 1187–1194.
- [167] M. Sumper, N. Kröger, *J. Mater. Chem.* **2004**, 14, 2059–2065.
- [168] N. Kröger, R. Deutzmann, M. Sumper, *Science* **1999**, 286, 1129–1132.
- [169] N. Kröger, R. Deutzmann, M. Sumper, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 26066–26070.
- [170] N. Kröger, S. Lorenz, E. Brunner, M. Sumper, *Science* **2002**, 298, 584–586.
- [171] M. Hildebrand, *Chem. Rev.* **2008**, 108, 4855–4874.
- [172] W. E. G. Müller, K. Wendt, C. Geppert, M. Wiens, A. Reiber, H. C. Schröder, *Biosens. Bioelectron.* **2006**, 21, 1149–1155.
- [173] B. Diehl-Seifert, B. Kurelec, R. K. Zahn, A. Dorn, B. Jericevic, G. Uhlenbruck, W. G. Müller, *J. Cell Sci.* **1985**, 79, 271–285.
- [174] T. Nakajima, B. E. Volcani, *Science* **1969**, 164, 1400–1401.

- [175] R. E. Hecky, K. Mopper, P. Kilham, E. T. Degens, *Mar. Biol.* **1973**, 19, 323–331.
- [176] M. A. Schumacher, K. Mizuno, H. P. Bächinger, *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 27566–27574.
- [177] G. E. Tilburey, S. V. Patwardhan, J. Huang, D. L. Kaplan, C. C. Perry, *J. Phys. Chem. B* **2007**, 111, 4630–4638.
- [178] A. Krasko, B. Lorenz, R. Batel, H. C. Schröder, I. M. Müller, W. E. G. Müller, *Eur. J. Biochem.* **2000**, 267, 4878–4887.
- [179] J. Y. Exposito, C. Cluzel, R. Garrone, C. Lethias, *Anat. Rec.* **2002**, 268, 302–316.
- [180] S. Heinemann, T. Coradin, M. F. Desimone, *Biomater. Sci.* **2013**, 1, 688–702.
- [181] S. Heinemann, H. Ehrlich, C. Knieb, T. Hanke, *Int. J. Mater. Res.* **2007**, 98, 603–608.
- [182] R. J. P. Corriu, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2001**, 2001, 1109.
- [183] S. Heinemann, C. Heinemann, R. Bernhardt, A. Reinstorf, B. Nies, M. Meyer, H. Worch, T. Hanke, *Acta Biomater.* **2009**, 5, 1979–1990.
- [184] R. K. Iler, *J. Colloid Interface Sci.* **1980**, 75, 138–148.
- [185] K. Mizuno, T. Hayashi, D. H. Peyton, H. P. Bächinger, *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 38072–38078.
- [186] W. Y. Chow, D. Bihan, C. J. Forman, D. A. Slatter, D. G. Reid, D. J. Wales, R. W. Farndale, M. J. Duer, *Sci. Rep.* **2015**, 5, 1–16.
- [187] K. I. Kivirikko, Y. Kishida, S. Sakakibara, D. J. Prockop, *BBA - Protein Struct.* **1972**, 271, 347–356.
- [188] C. M. Taylor, C. A. Weir, *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 1414–1421.
- [189] N. Jiravanichanun, C. Hongo, G. Wu, K. Noguchi, K. Okuyama, N. Nishino, T. Silva, *ChemBioChem* **2005**, 6, 1184–1187.
- [190] S. G. Lee, J. Y. Lee, J. Chmielewski, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 8429–

- 8432.
- [191] M. G. Venugopal, J. A. M. Ramshaw, E. Braswel, Z. Dan, B. Brodsky, *Biochemistry* **1994**, 33, 7948–7956.
- [192] J. Engel, H. T. Chen, D. J. Prockop, H. Klump, *Biopolymers* **1977**, 16, 601–622.
- [193] B. Brodsky, M. Li, C. G. Long, J. Apigo, J. Baum, *Biopolymers* **1992**, 32, 447–451.
- [194] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2149–2154.
- [195] J. Ottl, H. J. Musiol, L. Moroder, *J. Pept. Sci.* **1999**, 5, 103–110.
- [196] F. Weiher, *Dissertation, Philipps-Universität Marburg*. Marburg **2013**.
- [197] C. Priem, A. Geyer, *Org. Lett.* **2018**, 20, 162–165.
- [198] R. S. Erdmann, H. Wennemers, *Synthesis* **2009**, 143–147.
- [199] G. Bartoli, M. Bosco, M. Locatelli, E. Marcantoni, P. Melchiorre, L. Sambri, *Org. Lett.* **2005**, 7, 427–430.
- [200] H. Rink, *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 3787–3790.
- [201] B. Bacsa, B. Desai, G. Dibó, C. O. Kappe, *J. Org. Chem.* **2006**, 12, 633–638.
- [202] M. Körling, *Dissertation, Philipps-Universität Marburg* **2015**.
- [203] B. Bacsa, K. Horváti, S. Bösze, F. Andreae, C. O. Kappe, *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 7532–7542.
- [204] S. Giegold, T. Teutenberg, J. Tuerk, T. Kiffmeyer, B. Wencławiak, *J. Sep. Sci.* **2008**, 31, 3497–3502.
- [205] G. Vanhoenacker, P. Sandra, *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, 390, 245–248.
- [206] A. M. Acevedo-Jake, D. H. Ngo, J. D. Hartgerink, *Biomacromolecules* **2017**, 18, 1157–1161.
- [207] N. Dai, X. J. Wang, F. A. Etzkorn, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 5396–5397.

- [208] M. Kümin, L. S. Sonntag, H. Wennemers, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 466–467.
- [209] Y. P. Dick, A. Nordwig, *Arch. Biochem. Biophys.* **1966**, 117, 466–468.
- [210] P. H. von Hippel, K. Y. Wong, *Biochemistry* **1962**, 1, 664–674.
- [211] K. Mizuno, S. P. Boudko, J. Engel, H. P. Bächinger, *Biophys. J.* **2010**, 98, 3004–3014.
- [212] Y. Feng, G. Melacini, J. P. Taulane, M. Goodman, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 10351–10358.
- [213] S. T. Khew, Y. W. Tong, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2007**, 858, 79–90.
- [214] K. Okuyama, C. Hongo, G. Wu, K. Mizuno, K. Noguchi, S. Ebisuzaki, Y. Tanaka, N. Nishino, H. P. Bächinger, *Biopolymers* **2009**, 91, 361–372.
- [215] K. Kar, P. Amin, M. A. Bryan, A. V. Persikov, A. Mohs, Y. H. Wang, B. Brodsky, *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 33283–33290.
- [216] G. W. J. Fleet, J. C. Son, *Tetrahedron* **1988**, 44, 2637–2647.
- [217] J. C. Dho, G. W. J. Fleet, J. M. Peach, K. Prout, P. W. Smith, *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 3203–3204.
- [218] C. A. Weir, C. M. Taylor, *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 1554–1558.
- [219] F. Zanardi, L. Battistini, M. Nespi, G. Rassu, P. Spanu, M. Cornia, G. Casiraghi, *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, 7, 1167–1180.
- [220] K. K. Schumacher, J. Jiang, M. M. Joullie, *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, 9, 47–53.
- [221] R. Martín, M. Alcón, M. A. Pericás, A. Riera, *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 6896–6901.
- [222] J. Hühn, *Masterarbeit, Philipps-Universität Marburg* **2014**.
- [223] A. L. L. Garcia, C. R. D. Correia, *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 1553–1557.

- [224] C. Priem, A. Wuttke, M. Berditsch, A. S. Ulrich, A. Geyer, *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 12366–12376.
- [225] S. Jessel, C. Meier, *European J. Org. Chem.* **2011**, *7*, 1702–1713.
- [226] R. Badorrey, C. Cativiela, M. D. Díaz-De-Villegas, R. Díez, J. A. Gálvez, *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 719–722.
- [227] R. Rej, N. Jana, S. Kar, S. Nanda, *Tetrahedron:Asymmetry* **2012**, *23*, 364–372.
- [228] S. Al-Rawi, S. Hinderlich, W. Reutter, A. Giannis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 4366–4370.
- [229] E. J. Corey, M. C. Noe, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 319–329.
- [230] K. B. Sharpless, W. Amberg, Y. L. Bennani, G. A. Crispino, J. Hartung, K. S. Jeong, H. L. Kwong, K. Morikawa, Z. M. Wang, D. Xu, X. L. Zhang, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 2768–2771.
- [231] M. Passiniemi, A. M. P. Koskinen, *Synthesis* **2010**, 2816–2822.
- [232] P. Dupau, R. Epple, A. a. Thomas, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Adv. Synth. Catal.* **2002**, *344*, 421–433.
- [233] M. D. Shoulders, I. A. Guzei, R. T. Raines, *Biopolymers* **2008**, *89*, 443–454.
- [234] B. K. Ho, E. A. Courtsias, C. Seok, K. A. Dill, *Protein Sci.* **2005**, *14*, 1011–1018.
- [235] V. Leone, G. Lattanzi, C. Molteni, P. Carloni, *PLoS Comput. Biol.* **2009**, *5*, e1000309.
- [236] A. M. P. Koskinen, J. Helaja, E. T. T. Kumpulainen, J. Koivisto, H. Mansikkamäki, K. Rissanen, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 6447–6453.
- [237] J. A. Willms, R. Beel, M. L. Schmidt, C. Mundt, M. Engeser, *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, *10*, 2027–2037.
- [238] H. Bernard, G. Bülow, U. E. W. Lange, H. Mack, T. Pfeiffer, B. Schäfer, W. Seitz, T. Zierke, *Synthesis* **2004**, *3*, 2367–2375.

- [239] C. Smet, J. F. Duckert, J. M. Wieruszeski, I. Landrieu, L. Buée, G. Lippens, B. Déprez, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 4815–4823.
- [240] M. Brindisi *et al.*, *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *117*, 301–320.
- [241] L. Pickering, B. S. Malhi, P. L. Coe, R. T. Walker, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 2719–2728.
- [242] X. Qiu, F. Qing, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 3826–3837.
- [243] J.-U. Kahl, T. Wieland, *Liebigs Ann. Chem.* **1981**, 1445–1450.
- [244] M. De Zotti, F. Damato, F. Formaggio, M. Crisma, E. Schievano, S. Mammi, B. Kaptein, Q. B. Broxterman, P. J. Felock, D. J. Hazuda, S. B. Singh, J. Kirschbaum, H. Brückner, C. Toniolo, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 316–327.
- [245] T. R. Webb, C. Eigenbrot, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 3009–3016.
- [246] H. Ali Dondas, R. Grigg, J. Markandu, T. Perrior, T. Suzuki, S. Thibault, W. A. Thomas, M. Thornton-Pett, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 161–173.
- [247] B. Umezawa, O. Hoshino, S. Sawaki, H. Sashida, K. Mori, *Tetrahedron* **1984**, *40*, 1783–1790.
- [248] V. Kubyshkin, S. Afonin, S. Kara, N. Budisa, P. K. Mykhailiuk, A. S. Ulrich, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 3171–3181.
- [249] M. Rubini, M. A. Schärer, G. Capitani, R. Glockshuber, *ChemBioChem* **2013**, *14*, 1052–1057.
- [250] J. L. Flippen-Anderson, R. Gilardi, I. L. Karle, M. H. Frey, S. J. Opella, L. M. Gierasch, M. Goodman, V. Madison, N. G. Delaney, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 6609–6614.
- [251] W. Kim, K. I. Hardcastle, V. P. Conticello, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 8141–8145.
- [252] S. A. Cadamuro, R. Reichold, U. Kusebauch, H.-J. Musiol, C. Renner, P. Tavan, L. Moroder, *Angew. Chemie* **2008**, *120*, 2174–2177.
- [253] V. Kubyshkin, N. Budisa, *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 6764–6772.

- [254] A. K. Pandey, D. Naduthambi, K. M. Thomas, N. J. Zondlo, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 4333–4363.
- [255] L. S. Sonntag, S. Schweizer, C. Ochsenfeld, H. Wennemers, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14697–14703.
- [256] Y. K. Kang, *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 5463–5465.
- [257] Y. K. Kang, H. S. Park, *Biopolymers* **2009**, *92*, 387–398.
- [258] I. L. Karle, H. C. J. Ottenheym, B. Witkop, *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 539–543.
- [259] R. W. Adams, L. Byrne, P. Király, M. Foroozandeh, L. Paudel, M. Nilsson, J. Clayden, G. A. Morris, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 2512–2514.
- [260] J. Tanuwidjaja, H. M. Peltier, J. A. Ellman, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 626–629.
- [261] H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1982**, *21*, 512–523.
- [262] C. M. Deber, E. R. Blout, V. Madison, *Acc. Chem. Res.* **1976**, *9*, 106–113.
- [263] D. E. Dorman, F. A. Bovey, *J. Org. Chem.* **1973**, *38*, 2379–2383.
- [264] Y. L. Kang, N. S. Kang, *J. Comput. Chem.* **2007**, 1116–1127.
- [265] J. Bjerre, M. Bols, *European J. Org. Chem.* **2010**, 3487–3500.
- [266] K. C. Nicolaou, R. J. Aversa, J. Jin, F. Rivas, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 6855–6861.
- [267] S. Frank, R. A. Kammerer, D. Mechling, T. Schulthess, R. Landwehr, J. Bann, Y. Guo, A. Lustig, H. P. Bächinger, J. Engel, *J. Mol. Biol.* **2001**, *308*, 1081–1089.
- [268] Y. H. Ting, H. J. Chen, W. J. Cheng, J. C. Horng, *Biomacromolecules* **2018**, *19*, 2629–2637.
- [269] M. Körling, A. Geyer, *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, *2015*, 6448–6457.
- [270] M. Körling, A. Geyer, *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, *2015*, 2382–2387.
- [271] G. G. Gause, M. G. Brazhnikova, *Nature* **1944**, *154*, 703.

- [272] G. F. Gause, M. G. Brazhnikova, *Lancet* **1944**, 244, 715–716.
- [273] S. E. Hull, P. Karlsson, P. Main, M. M. Woolfson, E. J. Dodson, *Nature* **1978**, 275, 206–207.
- [274] E. J. Prenner, R. N. A. H. Lewis, R. N. McElhaney, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1999**, 1462, 201–221.
- [275] M. Ashrafuzzaman, O. S. Andersen, R. N. McElhaney, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2008**, 1778, 2814–2822.
- [276] M. Zasloff, *Nature* **2002**, 415, 389–395.
- [277] M. Berditsch, H. Lux, O. Babii, S. Afonin, A. S. Ulrich, *Pharmaceuticals* **2016**, 9, 1–14.
- [278] H. C. Neu, *Science* **1992**, 257, 1064–1073.
- [279] L. H. Kondejewski, S. W. Farmer, D. S. Wishart, R. E. Hancock, R. S. Hodges, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1996**, 47, 460–6.
- [280] L. H. Kondejewski, S. W. Farmer, D. S. Wishart, C. M. Kay, R. E. W. Hancock, R. S. Hodges, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 25261–25268.
- [281] M. Tamaki, I. Sasaki, M. Kokuno, M. Shindo, M. Kimura, Y. Uchida, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8, 1791–1797.
- [282] M. Tamaki, K. Takanashi, T. Harada, K. Fujinuma, M. Shindo, M. Kimura, Y. Uchida, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **2011**, 59, 1481–1484.
- [283] A. D. Knijnenburg, V. V. Kapoerchan, G. M. Grotenbreg, E. Spalburg, A. J. De Neeling, R. H. Mars-Groenendijk, D. Noort, J. M. Otero, A. L. Llamas-Saiz, M. J. Van Raaij, B. Ravensbergen, P. H. Nibbering, G. A. Van Der Marel, H. S. Overkleeft, M. Overhand, *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, 19, 3402–3409.
- [284] M. Tamaki, S. Akabori, C. Muramatsu, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1991**, 64, 583–587.
- [285] M. Tamaki, I. Sasaki, Y. Nakao, M. Shindo, M. Kimura, Y. Uchida, *J. Antibiot.* **2009**, 62, 597–599.

- [286] M. Tamaki, K. Fujinuma, T. Harada, K. Takanashi, M. Shindo, M. Kimura, Y. Uchida, *J. Antibiot.* **2011**, *64*, 583–585.
- [287] M. vanderKnaap, L. T. Lageveen, H. J. Busscher, R. Mars-Groenendijk, D. Noort, J. M. Otero, A. L. Llamas-Saiz, M. J. vanRaaij, G. A. vanderMarel, H. S. Overkleeft, M. Overhand, *ChemMedChem* **2011**, *6*, 840–847.
- [288] G. M. Grotenbreg, M. Kronemeijer, M. S. M. Timmer, F. El Oualid, R. M. Van Well, M. Verdoes, E. Spalburg, P. A. V. Van Hooft, A. J. De Neeling, D. Noort, J. H. Van Boom, G. A. Van Der Marel, H. S. Overkleeft, M. Overhand, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 7851–7859.
- [289] A. D. Knijnenburg, A. W. Tuin, E. Spalburg, A. J. De Neeling, R. H. Mars-Groenendijk, D. Noort, J. M. Otero, A. L. Llamas-Saiz, M. J. Van Raaij, G. A. Van Der Marel, H. S. Overkleeft, M. Overhand, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 3995–4004.
- [290] S. Pal, G. Singh, S. Singh, J. K. Tripathi, J. K. Ghosh, S. Sinha, R. S. Ampapathi, T. K. Chakraborty, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 6789–6802.
- [291] B. Legrand, L. Mathieu, A. Lebrun, S. Andriamanarivo, V. Lisowski, N. Masurier, S. Zirah, Y. K. Kang, J. Martinez, L. T. Maillard, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 6713–6720.
- [292] L. Ayres, G. M. Grotenbreg, G. A. Van Der Marel, H. S. Overkleeft, M. Overhand, J. C. M. Van Hest, *Macromol. Rapid Commun.* **2005**, *26*, 1336–1340.
- [293] A. W. Tuin, D. K. Palachanis, A. Buizert, G. M. Grotenbreg, E. Spalburg, A. J. De Neeling, R. H. Mars-Groenendijk, D. Noort, G. A. Van Der Marel, H. S. Overkleeft, M. Overhand, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 4231–4241.
- [294] K. Yamada, S. S. Shinoda, H. Oku, K. Komagoe, T. Katsu, R. Katakai, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 7592–7595.
- [295] G. M. Grotenbreg, E. Spalburg, A. J. De Neeling, G. A. Van Der Marel, H. S. Overkleeft, J. H. Van Boom, M. Overhand, *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 2835–2841.

- [296] K. Yamada, M. Unno, K. Kobayashi, H. Oku, H. Yamamura, S. Araki, H. Matsumoto, R. Katakai, M. Kawai, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12684–12688.
- [297] C. Solanas, B. G. De La Torre, M. Fernández-Reyes, C. M. Santiveri, M. Á. Jiménez, L. Rivas, A. I. Jiménez, D. Andreu, C. Cativiela, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 664–674.
- [298] N. J. Zondlo, *Acc Chem Res.* **2013**, *46*, 1039–1049.
- [299] G. M. Grotenbreg, M. S. M. Timmer, A. L. Llamas-Saiz, M. Verdoes, G. A. Van Der Marel, M. J. Van Raaij, H. S. Overkleeft, M. Overhand, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 3444–3446.
- [300] C. Samaniego Lopez, J. Hebe Martínez, M. L. Uhrig, F. Coluccio Leskow, C. C. Spagnuolo, *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 6344–6348.
- [301] R. S. Fuscaldo, P. H. V. Vontobel, E. O. Boeira, A. V. Moro, J. S. d. Costa, *European J. Org. Chem.* **2019**, *2019*, 2050–2055.
- [302] V. Alterio, R. Cadoni, D. Esposito, D. Vullo, A. Di Fiore, S. M. Monti, A. Caporale, M. Ruvo, M. Sechi, P. Dumy, C. T. Supuran, G. De Simone, J. Y. Winum, *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 11983–11986.
- [303] S. Grunder, C. Valente, A. C. Whalley, S. Sampath, J. Portmann, Y. Y. Botros, J. F. Stoddart, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 15632–15649.
- [304] H. R. Snyder, A. J. Reedy, W. J. Lennarz, *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 835–838.
- [305] M. Goodman, M. Bhumralkar, E. A. Jefferson, J. Kwak, E. Locardi, *Biopolymers* **1998**, *47*, 127–142.
- [306] Y. J. Lin, L. K. Chu, J. C. Horng, *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119*, 15796–15806.
- [307] Z. Wu, M. Li, H. Fang, B. Wang, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 7179–7182.
- [308] L. Zhang, J. A. Kerszulis, R. J. Clark, T. Ye, L. Zhu, *Chem. Commun.* **2009**, 2151–2153.

- [309] A. Adamczyk-Woźniak, K. M. Borys, I. D. Madura, A. Pawełko, E. Tomecka, K. Zukowski, *New J. Chem.* **2013**, 37, 188–194.
- [310] C. Roche, H. J. Sun, M. E. Prendergast, P. Leowanawat, B. E. Partridge, P. A. Heiney, F. Araoka, R. Graf, H. W. Spiess, X. Zeng, G. Ungar, V. Percec, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136, 7169–7185.
- [311] M. Peterca, V. Percec, M. R. Imam, P. Leowanawat, K. Morimitsu, P. A. Heiney, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 14840–14852.
- [312] R. A. Kirschner, A. Geyer, *ChemistrySelect* **2016**, 1, 4570–4576.
- [313] K. Shinoda, Y. Sohma, M. Kanai, *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2015**, 25, 2976–2979.
- [314] K. Tanizawa, K. Okumura, H. Itoh, Y. Hatanaka, Y. Kanaoka, *Biol. Pharm. Bull.* **1986**, 34, 4001–4011.
- [315] M. R. Knecht, D. W. Wright, *Chem. Commun.* **2003**, 9, 3038–3039.
- [316] C. C. Lechner, C. F. W. Becker, *Chem. Sci.* **2012**, 3, 3500–3504.
- [317] L. Senior, M. P. Crump, C. Williams, P. J. Booth, S. Mann, A. W. Perriman, P. Curnow, *J. Mater. Chem. B* **2015**, 3, 2607–2614.
- [318] E. L. Buckle, A. Roehrich, B. Vandermoon, G. P. Drobny, *Langmuir* **2017**, 33, 10517–10524.
- [319] A. Bernecker, R. Wieneke, R. Riedel, M. Seibt, A. Geyer, C. Steinem, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 1023–1031.
- [320] R. Wieneke, A. Bernecker, R. Riedel, M. Sumper, A. Geyer, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, 9, 5482–5486.
- [321] J. Egli, C. Siebler, M. Köhler, R. Zenobi, H. Wennemers, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, 141, 5607–5611.
- [322] T. J. Hyde, M. A. Bryan, B. Brodsky, J. Baum, *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 36937–36943.
- [323] A. Tarannum, C. Muvva, A. Mehta, J. R. Rao, N. N. Fathima, *RSC Adv.* **2016**,

- 6, 4022–4033.
- [324] F. Gobeaux, E. Belamie, G. Mosser, P. Davidson, P. Panine, M. M. Giraud-Guille, *Langmuir* **2007**, 23, 6411–6417.
- [325] G. C. Na, L. J. Butz, D. G. Bailey, R. J. Carroll, *Biochemistry* **1986**, 25, 958–966.
- [326] K. Kar, S. Ibrar, V. Nanda, T. M. Getz, S. P. Kunapuli, B. Brodsky, *Biochemistry* **2009**, 48, 7959–7968.
- [327] T. Dahl, A. Veis, *Connect. Tissue Res.* **2007**, 44, 206–213.
- [328] D. Eglin, G. Mosser, M. M. Giraud-Guille, J. Livage, T. Coradin, *Soft Matter* **2005**, 1, 129–131.
- [329] D. Eglin, K. L. Shafran, J. Livage, T. Coradin, C. C. Perry, *J. Mater. Chem.* **2006**, 16, 4220–4230.
- [330] T. Coradin, J. Livage, *Acc. Chem. Res.* **2007**, 40, 819–826.
- [331] O. Gräß, M. Abacilar, F. Daus, A. Geyer, C. Steinem, *Langmuir* **2016**, 32, 10144–10152.
- [332] M. Abacilar, F. Daus, C. Haas, S. I. Brückner, E. Brunner, A. Geyer, *RSC Adv.* **2016**, 6, 93343–93348.
- [333] R. K. Iler, *Chem. Silica* **1979**.
- [334] G. B. Alexander, *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, 75, 5655–5657.
- [335] S. V. Patwardhan, R. Maheshwari, N. Mukherjee, K. L. Kiick, S. J. Clarson, *Biomacromolecules* **2006**, 7, 491–497.
- [336] R. Tacke, *Angew. Chemie* **1999**, 111, 3197–3200.
- [337] D. Sadava, B. E. Volcani, *Planta* **1977**, 11, 7–11.
- [338] L. Yao, M. He, D. Li, H. Liu, J. Wu, J. Xiao, *New J. Chem.* **2018**, 42, 7439–7444.
- [339] N. Kröger, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, 11, 662–669.

- [340] M. Abacilar, F. Daus, A. Geyer, *Beilstein J. Nanotechnol.* **2015**, 6, 103–110.
- [341] K. Lutz, C. Gröger, M. Sumper, E. Brunner, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2005**, 7, 2812–2815.
- [342] L. D'Agostino, M. Di Pietro, A. Di Luccia, *FEBS J.* **2005**, 272, 3777–3787.
- [343] V. V. Annenkov, S. V. Patwardhan, D. Belton, E. N. Danilovtseva, C. C. Perry, *Chem. Commun.* **2006**, 1521–1523.
- [344] V. V. Annenkov, E. N. Danilovtseva, V. A. Pal'shin, V. O. Aseyev, A. K. Petrov, A. S. Kozlov, S. V. Patwardhan, C. C. Perry, *Biomacromolecules* **2011**, 12, 1772–1780.
- [345] J. M. Gebauer, A. Köhler, H. Dietmar, M. Gompert, I. Neundorf, F. Zaucke, M. Koch, U. Baumann, *Sci. Rep.* **2018**, 8:17187.
- [346] D. B. G. Williams, M. Lawton, *J. Org. Chem.* **2010**, 75, 8351–8354.
- [347] V. V. Annenkov, S. N. Zelinskiy, E. N. Danilovtseva, C. C. Perry, *Arkivoc* **2009**, 2009, 116–130.
- [348] H. E. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 7512–7515.
- [349] G. D. Yadav, S. Singh, *Tetrahedron:Asymmetry* **2015**, 26, 1156–1166.
- [350] J. E. Cheong, C. T. Pfeiffer, J. D. Northrup, M. F. L. Parker, C. E. Schafmeister, *Tetrahedron Lett.* **2016**, 57, 4882–4884.
- [351] J. K. Robinson, V. Lee, T. D. W. Claridge, J. E. Baldwin, C. J. Schofield, *Tetrahedron* **1998**, 54, 981–996.
- [352] C. R. Gade, M. Dixit, N. K. Sharma, *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, 24, 4016–4022.
- [353] M. Desroses, G. Laconde, P. Depreux, J.-P. Hénichart, *Org. Prep. Proced. int.* **2004**, 36, 445–452.
- [354] R. Poupko, Z. Luz, N. Spielberg, H. Zimmermann, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 6094–6105.
- [355] Q. Zhang, K. S. Raheem, N. P. Botting, A. M. Z. Slawin, C. D. Kay, D. O'Hagan, *Tetrahedron* **2012**, 68, 4194–4201.

- [356] T. M. Altamore, C. Fernández-García, A. H. Gordon, T. Hübscher, N. Promsawan, M. G. Ryadnov, A. J. Doig, D. N. Woolfson, T. Gallagher, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 11167–11171.
- [357] Z. Nikolovska-Coleska, J. L. Meagher, S. Jiang, S. A. Kawamoto, W. Gao, H. Yi, D. Qin, P. P. Roller, J. A. Stuckey, S. Wang, *Anal. Biochem.* **2008**, *374*, 87–98.

Anhang

Kristalldaten von Verbindung 10

Table 1

Crystal data

Identification code	cpms25
Habitus, colour	block, colorless
Crystal size	0.265 x 0.188 x 0.097 mm ³
Crystal system	Monoclinic
Space group	P2 ₁ Z = 4
Unit cell dimensions	a = 9.7727(4) Å $\alpha = 90^\circ$. b = 9.5061(4) Å $\beta = 99.170(2)^\circ$. c = 22.7303(10) Å $\gamma = 90^\circ$.
Volume	2084.66(15) Å ³
Cell determination	9935 peaks with 2Theta 5.111 to 50.38°.
Empirical formula	C ₂₁ H ₂₃ N O ₇ S
Formula weight	433.46
Density (calculated)	1.381 Mg/m ³
Absorption coefficient	0.199 mm ⁻¹
F(000)	912

Data collection:

Diffractometer type	Bruker D8 QUEST area detector
Wavelength	0.71073 Å
Temperature	100(2) K
Theta range for data collection	2.327 to 25.307°.
Index ranges	-11 ≤ h ≤ 11, -11 ≤ k ≤ 11, -27 ≤ l ≤ 27
Data collection software	BRUKER APEX II
Cell refinement software	BRUKER SAINT
Data reduction software	Bruker APEX II

Solution and refinement:

Reflections collected	57599
Independent reflections	7585 [R(int) = 0.0513]

Anhang

Completeness to $\theta = 25.125^\circ$	99.9 %
Observed reflections	7148[$I > 2(I)$]
Reflections used for refinement	7585
Extinction coefficient	$X = 0.0124(12)$
Flack parameter (absolute struct.)	0.021(19)
Largest diff. peak and hole	0.540 and -0.209 e. \AA^{-3}
Solution	direct / difmap
Refinement	Full-matrix least-squares on F^2
Treatment of hydrogen atoms	geom. / mixed
Programs used	Bruker APEX2 SHELXL-2014 (Sheldrick, 2014) DIAMOND (Crystal Impact)
Data / restraints / parameters	7585 / 1 / 544
Goodness-of-fit on F^2	1.086
R index (all data)	wR2 = 0.0924
R index conventional [$I > 2\sigma(I)$]	R1 = 0.0387

Table 2

Atomic coordinates and equivalent isotropic displacement parameters (\AA^2)

for cpms25_0m_a. $U(\text{eq})$ is defined as one third of the trace of the orthogonalized U^{ij} tensor.

	x	y	z	$U(\text{eq})$	Occupancy
C1	1.0203(4)	0.5718(4)	0.42199(16)	0.0139(8)	1
C2	0.9080(4)	0.6521(4)	0.38082(16)	0.0140(8)	1
C3	0.8394(4)	0.7386(4)	0.42469(16)	0.0135(7)	1
C4	0.9606(4)	0.7878(4)	0.47006(17)	0.0155(8)	1
C5	0.5204(4)	0.7629(4)	0.4561(2)	0.0267(9)	1
C6	1.1671(4)	0.6435(4)	0.51420(17)	0.0147(8)	1
C7	1.3010(4)	0.7294(4)	0.60269(18)	0.0234(9)	1
C8	1.2793(4)	0.6136(4)	0.64540(15)	0.0169(8)	1
C9	1.1505(4)	0.5860(5)	0.66183(18)	0.0252(9)	1
C10	1.1380(5)	0.4804(5)	0.70284(19)	0.0333(11)	1
C11	1.2517(5)	0.4047(5)	0.72813(18)	0.0307(11)	1
C12	1.3795(5)	0.4307(4)	0.71200(18)	0.0254(9)	1
C13	1.3924(4)	0.5346(4)	0.67059(17)	0.0200(8)	1
C14	1.1460(4)	0.5406(4)	0.39188(16)	0.0147(8)	1
C15	1.2681(4)	0.3642(4)	0.34914(18)	0.0210(8)	1
C16	1.2559(4)	0.2095(4)	0.33667(16)	0.0140(8)	1

Anhang

C17	1.2480(3)	0.1147(4)	0.38237(16)	0.0155(7)	1
C18	1.2392(4)	-0.0282(4)	0.37116(17)	0.0179(8)	1
C19	1.2400(4)	-0.0783(4)	0.31372(18)	0.0213(9)	1
C20	1.2475(4)	0.0157(5)	0.26789(18)	0.0235(9)	1
C21	1.2556(4)	0.1590(4)	0.27928(17)	0.0191(8)	1
C22	0.4207(4)	0.4261(4)	-0.07931(15)	0.0131(7)	1
C23	0.5018(4)	0.3440(4)	-0.12049(15)	0.0131(7)	1
C24	0.6032(4)	0.2592(4)	-0.07694(16)	0.0134(7)	1
C25	0.5176(4)	0.2118(4)	-0.03027(17)	0.0154(8)	1
C26	0.9484(4)	0.2326(4)	-0.03774(19)	0.0214(9)	1
C27	0.3425(4)	0.3545(4)	0.01318(16)	0.0146(8)	1
C28	0.2749(4)	0.2657(4)	0.10085(17)	0.0212(9)	1
C29	0.3417(4)	0.3690(4)	0.14637(15)	0.0182(8)	1
C30	0.4811(5)	0.3556(6)	0.1708(2)	0.0384(12)	1
C31	0.5402(6)	0.4497(8)	0.2143(2)	0.0570(18)	1
C32	0.4605(8)	0.5540(7)	0.2338(2)	0.060(2)	1
C33	0.3215(7)	0.5680(5)	0.2098(2)	0.0464(15)	1
C34	0.2637(5)	0.4748(4)	0.16621(18)	0.0268(9)	1
C35	0.2722(4)	0.4586(4)	-0.10828(15)	0.0122(7)	1
C36	0.1168(4)	0.6346(4)	-0.14887(18)	0.0178(8)	1
C37	0.1165(4)	0.7908(4)	-0.16079(16)	0.0131(7)	1
C38	0.1672(4)	0.8844(4)	-0.11620(16)	0.0173(8)	1
C39	0.1614(4)	1.0283(4)	-0.12704(18)	0.0190(8)	1
C40	0.1017(4)	1.0791(4)	-0.18290(18)	0.0214(9)	1
C41	0.0526(4)	0.9849(4)	-0.22737(17)	0.0222(9)	1
C42	0.0606(4)	0.8414(4)	-0.21700(17)	0.0193(8)	1
N1	1.0585(3)	0.6696(3)	0.47152(14)	0.0158(7)	1
N2	0.4219(3)	0.3310(3)	-0.02934(13)	0.0156(7)	1
O1	0.5853(3)	0.6087(4)	0.37034(12)	0.0337(7)	1
O2	0.5703(3)	0.4948(3)	0.46595(15)	0.0301(7)	1
O3	0.7615(2)	0.6442(3)	0.45825(11)	0.0147(6)	1
O4	1.1822(3)	0.7473(3)	0.55557(12)	0.0218(6)	1
O5	1.2414(3)	0.5413(3)	0.51481(12)	0.0185(6)	1
O6	1.2268(3)	0.6271(3)	0.38035(12)	0.0210(6)	1
O7	1.1497(3)	0.4042(2)	0.37751(12)	0.0158(6)	1
O8	0.8256(3)	0.3619(4)	-0.13192(12)	0.0288(7)	1
O9	0.9061(3)	0.5014(3)	-0.04223(14)	0.0285(7)	1
O10	0.7076(2)	0.3554(3)	-0.04501(10)	0.0153(5)	1
O11	0.1826(2)	0.3717(3)	-0.11857(11)	0.0176(6)	1

Anhang

O12	0.2575(2)	0.5948(3)	-0.12247(11)	0.0151(5)	1
O13	0.3540(3)	0.2477(3)	0.05249(11)	0.0199(6)	1
O14	0.2705(3)	0.4576(3)	0.01487(12)	0.0181(6)	1
S1	0.60336(9)	0.61445(9)	0.43352(4)	0.0159(2)	1
S2	0.85009(9)	0.37458(10)	-0.06899(4)	0.0149(2)	1

Table 3

Bond lengths [Å] and angles [°]

C1-N1	1.462(5)	C15-O7	1.462(4)
C1-C2	1.528(5)	C15-C16	1.499(5)
C1-C14	1.528(5)	C15-H15A	0.9900
C1-H1	1.0000	C15-H15B	0.9900
C2-C3	1.528(5)	C16-C17	1.386(5)
C2-H2A	0.9900	C16-C21	1.390(5)
C2-H2B	0.9900	C17-C18	1.382(6)
C3-O3	1.467(4)	C17-H17	0.9500
C3-C4	1.515(5)	C18-C19	1.391(6)
C3-H3	1.0000	C18-H18	0.9500
C4-N1	1.473(4)	C19-C20	1.383(6)
C4-H4A	0.9900	C19-H19	0.9500
C4-H4B	0.9900	C20-C21	1.387(6)
C5-S1	1.745(4)	C20-H20	0.9500
C5-H5A	0.9800	C21-H21	0.9500
C5-H5B	0.9800	C22-N2	1.451(5)
C5-H5C	0.9800	C22-C35	1.526(5)
C6-O5	1.212(4)	C22-C23	1.533(5)
C6-N1	1.342(5)	C22-H22	1.0000
C6-O4	1.355(5)	C23-C24	1.516(5)
C7-O4	1.459(4)	C23-H23A	0.9900
C7-C8	1.505(6)	C23-H23B	0.9900
C7-H7A	0.9900	C24-O10	1.472(4)
C7-H7B	0.9900	C24-C25	1.521(5)
C8-C13	1.383(6)	C24-H24	1.0000
C8-C9	1.394(5)	C25-N2	1.471(5)
C9-C10	1.389(7)	C25-H25A	0.9900
C9-H9	0.9500	C25-H25B	0.9900
C10-C11	1.371(7)	C26-S2	1.741(4)
C10-H10	0.9500	C26-H26A	0.9800
C11-C12	1.379(6)	C26-H26B	0.9800
C11-H11	0.9500	C26-H26C	0.9800
C12-C13	1.384(6)	C27-O14	1.211(4)
C12-H12	0.9500	C27-O13	1.345(5)
C13-H13	0.9500	C27-N2	1.351(5)
C14-O6	1.197(5)	C28-O13	1.451(4)
C14-O7	1.339(4)	C28-C29	1.498(5)

Anhang

C28-H28A	0.9900	C2-C1-C14	111.9(3)
C28-H28B	0.9900	N1-C1-H1	110.6
C29-C34	1.380(6)	C2-C1-H1	110.6
C29-C30	1.393(6)	C14-C1-H1	110.6
C30-C31	1.388(8)	C3-C2-C1	102.5(3)
C30-H30	0.9500	C3-C2-H2A	111.3
C31-C32	1.378(10)	C1-C2-H2A	111.3
C31-H31	0.9500	C3-C2-H2B	111.3
C32-C33	1.387(9)	C1-C2-H2B	111.3
C32-H32	0.9500	H2A-C2-H2B	109.2
C33-C34	1.381(7)	O3-C3-C4	104.4(3)
C33-H33	0.9500	O3-C3-C2	109.2(3)
C34-H34	0.9500	C4-C3-C2	103.5(3)
C35-O11	1.200(4)	O3-C3-H3	113.0
C35-O12	1.337(4)	C4-C3-H3	113.0
C36-O12	1.459(4)	C2-C3-H3	113.0
C36-C37	1.509(5)	N1-C4-C3	102.4(3)
C36-H36A	0.9900	N1-C4-H4A	111.3
C36-H36B	0.9900	C3-C4-H4A	111.3
C37-C38	1.381(5)	N1-C4-H4B	111.3
C37-C42	1.393(5)	C3-C4-H4B	111.3
C38-C39	1.389(6)	H4A-C4-H4B	109.2
C38-H38	0.9500	S1-C5-H5A	109.5
C39-C40	1.396(6)	S1-C5-H5B	109.5
C39-H39	0.9500	H5A-C5-H5B	109.5
C40-C41	1.378(6)	S1-C5-H5C	109.5
C40-H40	0.9500	H5A-C5-H5C	109.5
C41-C42	1.384(6)	H5B-C5-H5C	109.5
C41-H41	0.9500	O5-C6-N1	124.1(3)
C42-H42	0.9500	O5-C6-O4	125.3(3)
O1-S1	1.420(3)	N1-C6-O4	110.7(3)
O2-S1	1.420(3)	O4-C7-C8	112.4(3)
O3-S1	1.583(3)	O4-C7-H7A	109.1
O8-S2	1.417(3)	C8-C7-H7A	109.1
O9-S2	1.420(3)	O4-C7-H7B	109.1
O10-S2	1.585(2)	C8-C7-H7B	109.1
		H7A-C7-H7B	107.9
N1-C1-C2	103.0(3)	C13-C8-C9	118.9(4)
N1-C1-C14	110.1(3)	C13-C8-C7	118.6(3)

Anhang

C9-C8-C7	122.5(4)	C21-C20-H20	119.9
C10-C9-C8	119.7(4)	C20-C21-C16	120.4(4)
C10-C9-H9	120.1	C20-C21-H21	119.8
C8-C9-H9	120.1	C16-C21-H21	119.8
C11-C10-C9	120.6(4)	N2-C22-C35	110.6(3)
C11-C10-H10	119.7	N2-C22-C23	102.7(3)
C9-C10-H10	119.7	C35-C22-C23	112.8(3)
C10-C11-C12	120.1(4)	N2-C22-H22	110.1
C10-C11-H11	119.9	C35-C22-H22	110.1
C12-C11-H11	119.9	C23-C22-H22	110.1
C11-C12-C13	119.5(4)	C24-C23-C22	102.7(3)
C11-C12-H12	120.2	C24-C23-H23A	111.2
C13-C12-H12	120.2	C22-C23-H23A	111.2
C8-C13-C12	121.1(4)	C24-C23-H23B	111.2
C8-C13-H13	119.5	C22-C23-H23B	111.2
C12-C13-H13	119.5	H23A-C23-H23B	109.1
O6-C14-O7	124.6(3)	O10-C24-C23	108.8(3)
O6-C14-C1	124.8(3)	O10-C24-C25	104.8(3)
O7-C14-C1	110.6(3)	C23-C24-C25	103.8(3)
O7-C15-C16	107.1(3)	O10-C24-H24	112.9
O7-C15-H15A	110.3	C23-C24-H24	112.9
C16-C15-H15A	110.3	C25-C24-H24	112.9
O7-C15-H15B	110.3	N2-C25-C24	101.7(3)
C16-C15-H15B	110.3	N2-C25-H25A	111.4
H15A-C15-H15B	108.5	C24-C25-H25A	111.4
C17-C16-C21	119.1(4)	N2-C25-H25B	111.4
C17-C16-C15	120.5(3)	C24-C25-H25B	111.4
C21-C16-C15	120.3(3)	H25A-C25-H25B	109.3
C18-C17-C16	120.6(3)	S2-C26-H26A	109.5
C18-C17-H17	119.7	S2-C26-H26B	109.5
C16-C17-H17	119.7	H26A-C26-H26B	109.5
C17-C18-C19	120.0(4)	S2-C26-H26C	109.5
C17-C18-H18	120.0	H26A-C26-H26C	109.5
C19-C18-H18	120.0	H26B-C26-H26C	109.5
C20-C19-C18	119.6(4)	O14-C27-O13	125.3(3)
C20-C19-H19	120.2	O14-C27-N2	124.0(3)
C18-C19-H19	120.2	O13-C27-N2	110.7(3)
C19-C20-C21	120.2(4)	O13-C28-C29	112.0(3)
C19-C20-H20	119.9	O13-C28-H28A	109.2

Anhang

C29-C28-H28A	109.2	C40-C39-H39	120.0
O13-C28-H28B	109.2	C41-C40-C39	119.2(4)
C29-C28-H28B	109.2	C41-C40-H40	120.4
H28A-C28-H28B	107.9	C39-C40-H40	120.4
C34-C29-C30	119.5(4)	C40-C41-C42	120.8(4)
C34-C29-C28	120.1(4)	C40-C41-H41	119.6
C30-C29-C28	120.4(4)	C42-C41-H41	119.6
C31-C30-C29	119.7(5)	C41-C42-C37	120.0(4)
C31-C30-H30	120.2	C41-C42-H42	120.0
C29-C30-H30	120.2	C37-C42-H42	120.0
C32-C31-C30	120.0(5)	C6-N1-C1	121.0(3)
C32-C31-H31	120.0	C6-N1-C4	126.4(3)
C30-C31-H31	120.0	C1-N1-C4	112.5(3)
C31-C32-C33	120.7(5)	C27-N2-C22	121.5(3)
C31-C32-H32	119.6	C27-N2-C25	125.2(3)
C33-C32-H32	119.6	C22-N2-C25	113.3(3)
C34-C33-C32	118.9(5)	C3-O3-S1	118.8(2)
C34-C33-H33	120.6	C6-O4-C7	114.2(3)
C32-C33-H33	120.6	C14-O7-C15	114.4(3)
C29-C34-C33	121.2(5)	C24-O10-S2	118.7(2)
C29-C34-H34	119.4	C35-O12-C36	114.1(3)
C33-C34-H34	119.4	C27-O13-C28	114.5(3)
O11-C35-O12	125.0(3)	O1-S1-O2	119.5(2)
O11-C35-C22	124.0(3)	O1-S1-O3	108.84(15)
O12-C35-C22	111.0(3)	O2-S1-O3	104.39(16)
O12-C36-C37	107.6(3)	O1-S1-C5	109.9(2)
O12-C36-H36A	110.2	O2-S1-C5	109.9(2)
C37-C36-H36A	110.2	O3-S1-C5	102.94(18)
O12-C36-H36B	110.2	O8-S2-O9	119.7(2)
C37-C36-H36B	110.2	O8-S2-O10	108.71(15)
H36A-C36-H36B	108.5	O9-S2-O10	104.49(16)
C38-C37-C42	119.5(3)	O8-S2-C26	109.8(2)
C38-C37-C36	120.8(3)	O9-S2-C26	109.48(18)
C42-C37-C36	119.6(3)	O10-S2-C26	103.19(17)
C37-C38-C39	120.3(3)		
C37-C38-H38	119.8		
C39-C38-H38	119.8		
C38-C39-C40	120.1(4)		
C38-C39-H39	120.0		

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms:

Table 4

Anisotropic displacement (\AA^2) for cpms25_0m_a.The anisotropic displacement factor exponent takes the form: $-2\pi^2 [h^2 a^{*2} U^{11} + \dots + 2 h k a^* b^* U^{12}]$

	U^{11}	U^{22}	U^{33}	U^{23}	U^{13}	U^{12}
C1	0.0183(19)	0.0106(18)	0.0123(17)	0.0020(14)	0.0009(15)	-0.0043(14)
C2	0.0160(18)	0.0148(18)	0.0112(17)	0.0001(14)	0.0024(14)	0.0025(15)
C3	0.0130(18)	0.0124(18)	0.0158(18)	0.0044(15)	0.0044(14)	0.0016(14)
C4	0.0150(18)	0.0094(18)	0.0220(19)	-0.0025(15)	0.0028(15)	0.0035(14)
C5	0.016(2)	0.018(2)	0.047(3)	-0.0011(19)	0.0073(18)	0.0067(16)
C6	0.0154(18)	0.0103(18)	0.0190(19)	0.0023(14)	0.0048(15)	-0.0023(15)
C7	0.019(2)	0.021(2)	0.025(2)	0.0011(17)	-0.0114(17)	-0.0049(17)
C8	0.0158(18)	0.0183(19)	0.0149(17)	-0.0088(16)	-0.0027(14)	-0.0049(16)
C9	0.0155(19)	0.033(2)	0.027(2)	-0.0121(19)	0.0020(16)	-0.0030(17)
C10	0.025(2)	0.053(3)	0.025(2)	-0.016(2)	0.0152(19)	-0.019(2)
C11	0.040(3)	0.035(3)	0.016(2)	-0.0009(18)	0.0009(18)	-0.021(2)
C12	0.027(2)	0.025(2)	0.024(2)	0.0035(17)	0.0011(18)	-0.0057(18)
C13	0.0167(19)	0.024(2)	0.020(2)	0.0021(17)	0.0040(16)	-0.0063(16)
C14	0.0189(19)	0.0087(18)	0.0152(18)	-0.0003(14)	-0.0014(15)	0.0024(15)
C15	0.0192(19)	0.0148(19)	0.033(2)	-0.0002(18)	0.0161(16)	0.0049(17)
C16	0.0093(17)	0.0144(19)	0.0199(18)	0.0029(15)	0.0066(14)	0.0055(14)
C17	0.0123(17)	0.0199(19)	0.0153(18)	-0.0017(16)	0.0049(14)	0.0036(16)
C18	0.0145(19)	0.017(2)	0.023(2)	0.0070(16)	0.0060(16)	0.0028(15)
C19	0.018(2)	0.0120(19)	0.034(2)	-0.0087(16)	0.0064(17)	-0.0023(15)
C20	0.023(2)	0.031(2)	0.0171(19)	-0.0064(17)	0.0030(16)	0.0042(18)
C21	0.0160(19)	0.026(2)	0.0158(19)	0.0050(16)	0.0040(15)	0.0070(16)
C22	0.0144(18)	0.0132(18)	0.0123(18)	-0.0017(14)	0.0043(14)	-0.0034(14)
C23	0.0152(17)	0.0137(19)	0.0098(16)	-0.0030(14)	0.0005(14)	0.0034(14)
C24	0.0132(18)	0.0104(18)	0.0166(18)	-0.0029(15)	0.0020(14)	0.0001(14)
C25	0.0161(18)	0.0117(18)	0.0187(18)	0.0024(14)	0.0033(15)	0.0038(15)
C26	0.018(2)	0.0148(19)	0.032(2)	0.0031(17)	0.0035(17)	0.0057(16)
C27	0.0150(18)	0.014(2)	0.0143(17)	-0.0028(15)	0.0025(14)	-0.0045(15)
C28	0.027(2)	0.022(2)	0.0183(19)	-0.0013(16)	0.0134(16)	-0.0076(17)
C29	0.0215(19)	0.022(2)	0.0134(17)	0.0010(17)	0.0089(14)	-0.0085(17)
C30	0.025(2)	0.056(3)	0.035(3)	-0.002(2)	0.007(2)	-0.008(2)
C31	0.038(3)	0.099(5)	0.031(3)	0.004(3)	-0.001(2)	-0.037(3)
C32	0.107(6)	0.055(4)	0.017(2)	-0.002(2)	0.007(3)	-0.056(4)
C33	0.102(5)	0.019(2)	0.022(2)	-0.0019(19)	0.025(3)	-0.008(3)

Anhang

C34	0.044(3)	0.021(2)	0.017(2)	0.0046(17)	0.0100(18)	-0.0004(19)
C35	0.0161(19)	0.0111(18)	0.0103(16)	0.0000(14)	0.0045(14)	0.0025(15)
C36	0.0089(17)	0.016(2)	0.027(2)	0.0022(16)	-0.0012(15)	0.0017(15)
C37	0.0092(17)	0.0115(18)	0.0189(18)	0.0003(15)	0.0029(14)	0.0021(14)
C38	0.0154(18)	0.021(2)	0.0156(18)	0.0015(16)	0.0022(14)	0.0002(17)
C39	0.0166(19)	0.0148(19)	0.024(2)	-0.0057(16)	-0.0004(16)	0.0007(15)
C40	0.0198(19)	0.0111(19)	0.035(2)	0.0053(16)	0.0082(17)	0.0003(15)
C41	0.024(2)	0.025(2)	0.0172(19)	0.0096(17)	0.0015(16)	0.0016(17)
C42	0.0189(19)	0.023(2)	0.0147(18)	-0.0048(16)	0.0001(15)	-0.0016(16)
N1	0.0170(16)	0.0119(15)	0.0172(16)	-0.0033(13)	-0.0017(13)	0.0065(12)
N2	0.0181(16)	0.0147(16)	0.0152(15)	0.0026(12)	0.0066(13)	0.0070(12)
O1	0.0234(15)	0.056(2)	0.0204(14)	-0.0101(16)	0.0005(12)	-0.0118(16)
O2	0.0288(17)	0.0143(15)	0.0494(19)	0.0023(13)	0.0133(14)	-0.0038(12)
O3	0.0146(13)	0.0152(14)	0.0143(12)	0.0031(10)	0.0026(10)	0.0022(10)
O4	0.0213(14)	0.0147(14)	0.0243(14)	-0.0049(12)	-0.0120(11)	0.0005(11)
O5	0.0151(14)	0.0160(14)	0.0237(14)	0.0040(11)	0.0005(11)	0.0040(11)
O6	0.0210(14)	0.0098(13)	0.0340(16)	0.0025(12)	0.0104(12)	0.0004(12)
O7	0.0161(13)	0.0078(13)	0.0254(14)	-0.0007(10)	0.0093(11)	0.0021(10)
O8	0.0199(14)	0.049(2)	0.0181(14)	0.0076(15)	0.0040(11)	-0.0050(15)
O9	0.0218(15)	0.0138(14)	0.0480(19)	0.0020(13)	0.0002(14)	-0.0032(12)
O10	0.0133(12)	0.0160(14)	0.0162(12)	-0.0027(11)	0.0011(10)	-0.0018(11)
O11	0.0149(13)	0.0111(13)	0.0260(14)	0.0001(12)	0.0007(10)	0.0001(12)
O12	0.0111(12)	0.0089(12)	0.0242(13)	0.0005(11)	-0.0001(10)	0.0009(10)
O13	0.0311(15)	0.0140(14)	0.0177(13)	-0.0003(11)	0.0132(12)	-0.0022(12)
O14	0.0158(14)	0.0185(14)	0.0213(14)	-0.0038(11)	0.0067(11)	0.0018(11)
S1	0.0150(4)	0.0145(5)	0.0186(4)	-0.0035(4)	0.0035(3)	-0.0030(4)
S2	0.0127(4)	0.0139(4)	0.0175(4)	0.0044(4)	0.0010(3)	-0.0014(4)

Table 5

Hydrogen coordinates and isotropic displacement parameters (\AA^2) for cpms25_0m_a.

	x	y	z	U(eq)	Occupancy
H1	0.9819	0.4828	0.4362	0.017	1
H2A	0.9488	0.7135	0.3530	0.017	1
H2B	0.8410	0.5869	0.3576	0.017	1
H3	0.7820	0.8180	0.4052	0.016	1
H4A	1.0010	0.8758	0.4571	0.019	1
H4B	0.9326	0.8029	0.5096	0.019	1
H5A	0.4198	0.7512	0.4458	0.040	1
H5B	0.5494	0.8462	0.4359	0.040	1
H5C	0.5455	0.7746	0.4993	0.040	1
H7A	1.3184	0.8188	0.6250	0.028	1
H7B	1.3841	0.7079	0.5845	0.028	1
H9	1.0716	0.6392	0.6450	0.030	1
H10	1.0499	0.4605	0.7135	0.040	1
H11	1.2423	0.3341	0.7568	0.037	1
H12	1.4581	0.3776	0.7292	0.030	1
H13	1.4804	0.5519	0.6593	0.024	1
H15A	1.3559	0.3850	0.3759	0.025	1
H15B	1.2669	0.4172	0.3116	0.025	1
H17	1.2486	0.1484	0.4218	0.019	1
H18	1.2327	-0.0922	0.4027	0.022	1
H19	1.2354	-0.1765	0.3060	0.026	1
H20	1.2470	-0.0180	0.2285	0.028	1
H21	1.2610	0.2231	0.2477	0.023	1
H22	0.4705	0.5151	-0.0658	0.016	1
H23A	0.4398	0.2818	-0.1478	0.016	1
H23B	0.5509	0.4084	-0.1443	0.016	1
H24	0.6451	0.1790	-0.0963	0.016	1
H25A	0.4669	0.1236	-0.0423	0.019	1
H25B	0.5761	0.1982	0.0090	0.019	1
H26A	0.8999	0.1447	-0.0502	0.032	1
H26B	0.9618	0.2399	0.0058	0.032	1
H26C	1.0388	0.2333	-0.0512	0.032	1
H28A	0.2662	0.1738	0.1203	0.025	1

Anhang

H28B	0.1805	0.2989	0.0844	0.025	1
H30	0.5354	0.2825	0.1579	0.046	1
H31	0.6357	0.4422	0.2305	0.068	1
H32	0.5011	0.6170	0.2641	0.072	1
H33	0.2669	0.6405	0.2232	0.056	1
H34	0.1686	0.4837	0.1495	0.032	1
H36A	0.0513	0.6120	-0.1212	0.021	1
H36B	0.0880	0.5825	-0.1865	0.021	1
H38	0.2064	0.8504	-0.0779	0.021	1
H39	0.1981	1.0922	-0.0964	0.023	1
H40	0.0950	1.1775	-0.1902	0.026	1
H41	0.0128	1.0188	-0.2656	0.027	1
H42	0.0280	0.7775	-0.2482	0.023	1

Anhang

Table 6

Torsion angles [°]

N1-C1-C2-C3	-31.8(3)	O13-C28-C29-C30	-51.0(5)
C14-C1-C2-C3	-150.0(3)	C34-C29-C30-C31	-0.8(7)
C1-C2-C3-O3	-70.1(3)	C28-C29-C30-C31	-178.1(4)
C1-C2-C3-C4	40.6(3)	C29-C30-C31-C32	1.3(8)
O3-C3-C4-N1	81.3(3)	C30-C31-C32-C33	-1.2(8)
C2-C3-C4-N1	-32.9(3)	C31-C32-C33-C34	0.5(7)
O4-C7-C8-C13	146.3(4)	C30-C29-C34-C33	0.2(6)
O4-C7-C8-C9	-35.7(5)	C28-C29-C34-C33	177.4(4)
C13-C8-C9-C10	-0.1(6)	C32-C33-C34-C29	0.0(6)
C7-C8-C9-C10	-178.1(4)	N2-C22-C35-O11	-43.9(5)
C8-C9-C10-C11	1.2(6)	C23-C22-C35-O11	70.6(4)
C9-C10-C11-C12	-1.5(6)	N2-C22-C35-O12	138.4(3)
C10-C11-C12-C13	0.6(6)	C23-C22-C35-O12	-107.1(3)
C9-C8-C13-C12	-0.7(6)	O12-C36-C37-C38	-52.8(4)
C7-C8-C13-C12	177.3(4)	O12-C36-C37-C42	129.1(3)
C11-C12-C13-C8	0.5(6)	C42-C37-C38-C39	0.7(5)
N1-C1-C14-O6	-43.5(5)	C36-C37-C38-C39	-177.4(3)
C2-C1-C14-O6	70.4(5)	C37-C38-C39-C40	1.2(6)
N1-C1-C14-O7	139.6(3)	C38-C39-C40-C41	-1.9(6)
C2-C1-C14-O7	-106.6(3)	C39-C40-C41-C42	0.7(6)
O7-C15-C16-C17	-56.6(4)	C40-C41-C42-C37	1.2(6)
O7-C15-C16-C21	124.9(3)	C38-C37-C42-C41	-1.9(6)
C21-C16-C17-C18	-0.3(5)	C36-C37-C42-C41	176.3(4)
C15-C16-C17-C18	-178.8(3)	O5-C6-N1-C1	1.1(6)
C16-C17-C18-C19	0.8(6)	O4-C6-N1-C1	-179.5(3)
C17-C18-C19-C20	-1.0(6)	O5-C6-N1-C4	176.7(3)
C18-C19-C20-C21	0.7(6)	O4-C6-N1-C4	-4.0(5)
C19-C20-C21-C16	-0.2(6)	C2-C1-N1-C6	-172.1(3)
C17-C16-C21-C20	0.0(6)	C14-C1-N1-C6	-52.6(4)
C15-C16-C21-C20	178.5(4)	C2-C1-N1-C4	11.8(4)
N2-C22-C23-C24	-31.2(3)	C14-C1-N1-C4	131.3(3)
C35-C22-C23-C24	-150.4(3)	C3-C4-N1-C6	-162.6(3)
C22-C23-C24-O10	-70.9(3)	C3-C4-N1-C1	13.2(4)
C22-C23-C24-C25	40.3(3)	O14-C27-N2-C22	-3.7(6)
O10-C24-C25-N2	81.2(3)	O13-C27-N2-C22	175.8(3)
C23-C24-C25-N2	-32.8(3)	O14-C27-N2-C25	175.5(3)
O13-C28-C29-C34	131.7(4)	O13-C27-N2-C25	-5.0(5)

Anhang

C35-C22-N2-C27	-48.9(4)
C23-C22-N2-C27	-169.6(3)
C35-C22-N2-C25	131.8(3)
C23-C22-N2-C25	11.1(4)
C24-C25-N2-C27	-165.8(3)
C24-C25-N2-C22	13.5(4)
C4-C3-O3-S1	158.5(2)
C2-C3-O3-S1	-91.3(3)
O5-C6-O4-C7	1.2(5)
N1-C6-O4-C7	-178.1(3)
C8-C7-O4-C6	-72.5(4)
O6-C14-O7-C15	3.8(5)
C1-C14-O7-C15	-179.2(3)
C16-C15-O7-C14	179.6(3)
C23-C24-O10-S2	-95.4(3)
C25-C24-O10-S2	154.1(2)
O11-C35-O12-C36	4.0(5)
C22-C35-O12-C36	-178.3(3)
C37-C36-O12-C35	178.6(3)
O14-C27-O13-C28	-2.1(5)
N2-C27-O13-C28	178.4(3)
C29-C28-O13-C27	-75.6(4)
C3-O3-S1-O1	36.4(3)
C3-O3-S1-O2	165.1(3)
C3-O3-S1-C5	-80.2(3)
C24-O10-S2-O8	33.0(3)
C24-O10-S2-O9	161.9(2)
C24-O10-S2-C26	-83.6(3)

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms:

Kristalldaten von Verbindung 17

Table 1

Crystal data

Identification code	chp027	
Habitus, colour	block, colorless	
Crystal size	0.206 x 0.131 x 0.070 mm ³	
Crystal system	Orthorhombic	
Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	Z = 4
Unit cell dimensions	a = 8.1297(8) Å	a = 90°.
	b = 10.7261(11) Å	b = 90°.
	c = 17.974(2) Å	g = 90°.
Volume	1567.3(3) Å ³	
Cell determination	6203 peaks with 2Theta 4.532 to 50.53°.	
Empirical formula	C ₁₂ H ₂₁ N O ₇ S	
Formula weight	323.36	
Density (calculated)	1.370 Mg/m ³	
Absorption coefficient	0.237 mm ⁻¹	
F(000)	688	

Data collection:

Diffractometer type	Bruker D8 QUEST area detector
Wavelength	0.71073 Å
Temperature	100(2) K
Theta range for data collection	2.211 to 25.298°.
Index ranges	-9<=h<=8, -12<=k<=12, -21<=l<=21
Data collection software	BRUKER APEX II
Cell refinement software	BRUKER SAINT
Data reduction software	Bruker APEX II

Solution and refinement:

Reflections collected	8379
-----------------------	------

Anhang

Independent reflections	2836 [R(int) = 0.0255]
Completeness to theta = 25.125°	100.0 %
Observed reflections	2645[$I > 2(I)$]
Reflections used for refinement	2836
Extinction coefficient	$X = 0.0152(15)$
Flack parameter (absolute struct.)	0.01(3)
Largest diff. peak and hole	0.230 and -0.296 e.Å ⁻³
Solution	direct/ difmap
Refinement	Full-matrix least-squares on F^2
Treatment of hydrogen atoms	geom, mixed
Programs used	BRUKER APEX II SHELXL-2014 (Sheldrick, 2014) DIAMOND (Crystal Impact)
Data / restraints / parameters	2836 / 0 / 196
Goodness-of-fit on F^2	1.079
R index (all data)	wR2 = 0.0638
R index conventional [$I > 2\sigma(I)$]	R1 = 0.0283

Table 2

Atomic coordinates and equivalent isotropic displacement parameters (\AA^2)for chp027_0m_a. U(eq) is defined as one third of the trace of the orthogonalized U_{ij} tensor.

	x	y	z	U(eq)	Occupancy
C1	1.0697(3)	0.9628(2)	0.50710(14)	0.0218(6)	1
C2	1.0212(3)	0.7720(2)	0.37392(13)	0.0131(5)	1
C3	0.9606(3)	0.6393(2)	0.36320(12)	0.0130(5)	1
C4	0.8936(3)	0.7627(2)	0.25352(12)	0.0112(5)	1
C5	1.0391(3)	0.8226(2)	0.29508(13)	0.0131(5)	1
C6	0.9400(3)	0.7344(2)	0.17357(13)	0.0120(5)	1
C7	0.9834(4)	0.8284(3)	0.05661(14)	0.0282(7)	1
C8	0.7237(3)	0.5784(2)	0.28523(13)	0.0114(5)	1
C9	0.4823(3)	0.5655(2)	0.20294(13)	0.0148(5)	1
C10	0.5193(3)	0.4366(2)	0.17133(15)	0.0210(6)	1
C11	0.4267(3)	0.6543(2)	0.14233(13)	0.0225(6)	1
C12	0.3599(3)	0.5614(2)	0.26635(14)	0.0176(6)	1
N1	0.8594(2)	0.64962(18)	0.29604(10)	0.0124(4)	1
O1	0.9151(3)	0.75361(16)	0.53189(10)	0.0272(5)	1
O2	0.7511(2)	0.94179(17)	0.51010(10)	0.0276(5)	1
O3	0.8910(2)	0.84817(14)	0.40812(8)	0.0135(4)	1
O4	0.9864(2)	0.63543(15)	0.15009(9)	0.0185(4)	1
O5	0.9275(2)	0.83818(15)	0.13296(9)	0.0188(4)	1
O6	0.6893(2)	0.48708(14)	0.32245(9)	0.0150(4)	1
O7	0.63744(19)	0.62423(15)	0.22762(8)	0.0137(4)	1
S1	0.89460(8)	0.87016(5)	0.49480(3)	0.01614(17)	1

Table 3

Bond lengths [Å] and angles [°] for
chp027_0m_a.

C1-S1	1.750(3)	C12-H12A	0.9800
C1-H1A	0.9800	C12-H12B	0.9800
C1-H1B	0.9800	C12-H12C	0.9800
C1-H1C	0.9800	O1-S1	1.4265(18)
C2-O3	1.472(3)	O2-S1	1.4234(19)
C2-C3	1.519(3)	O3-S1	1.5760(15)
C2-C5	1.524(3)		
C2-H2	1.0000	S1-C1-H1A	109.5
C3-N1	1.465(3)	S1-C1-H1B	109.5
C3-H3A	0.9900	H1A-C1-H1B	109.5
C3-H3B	0.9900	S1-C1-H1C	109.5
C4-N1	1.460(3)	H1A-C1-H1C	109.5
C4-C6	1.517(3)	H1B-C1-H1C	109.5
C4-C5	1.539(3)	O3-C2-C3	109.86(19)
C4-H4	1.0000	O3-C2-C5	105.02(18)
C5-H5A	0.9900	C3-C2-C5	104.27(18)
C5-H5B	0.9900	O3-C2-H2	112.4
C6-O4	1.203(3)	C3-C2-H2	112.4
C6-O5	1.335(3)	C5-C2-H2	112.4
C7-O5	1.449(3)	N1-C3-C2	102.47(18)
C7-H7A	0.9800	N1-C3-H3A	111.3
C7-H7B	0.9800	C2-C3-H3A	111.3
C7-H7C	0.9800	N1-C3-H3B	111.3
C8-O6	1.219(3)	C2-C3-H3B	111.3
C8-O7	1.344(3)	H3A-C3-H3B	109.2
C8-N1	1.356(3)	N1-C4-C6	112.12(18)
C9-O7	1.478(3)	N1-C4-C5	103.80(18)
C9-C12	1.514(3)	C6-C4-C5	110.62(19)
C9-C11	1.516(3)	N1-C4-H4	110.1
C9-C10	1.525(3)	C6-C4-H4	110.1
C10-H10A	0.9800	C5-C4-H4	110.1
C10-H10B	0.9800	C2-C5-C4	103.27(19)
C10-H10C	0.9800	C2-C5-H5A	111.1
C11-H11A	0.9800	C4-C5-H5A	111.1
C11-H11B	0.9800	C2-C5-H5B	111.1
C11-H11C	0.9800	C4-C5-H5B	111.1

Anhang

H5A-C5-H5B	109.1	C4-N1-C3	112.79(18)
O4-C6-O5	124.6(2)	C2-O3-S1	118.84(14)
O4-C6-C4	126.0(2)	C6-O5-C7	115.67(18)
O5-C6-C4	109.37(19)	C8-O7-C9	121.39(18)
O5-C7-H7A	109.5	O2-S1-O1	118.57(12)
O5-C7-H7B	109.5	O2-S1-O3	104.86(10)
H7A-C7-H7B	109.5	O1-S1-O3	109.45(10)
O5-C7-H7C	109.5	O2-S1-C1	109.62(12)
H7A-C7-H7C	109.5	O1-S1-C1	110.09(12)
H7B-C7-H7C	109.5	O3-S1-C1	103.01(11)
O6-C8-O7	126.7(2)		
O6-C8-N1	124.1(2)		
O7-C8-N1	109.23(19)		
O7-C9-C12	110.33(19)		
O7-C9-C11	101.69(18)		
C12-C9-C11	111.3(2)		
O7-C9-C10	109.29(19)		
C12-C9-C10	112.6(2)		
C11-C9-C10	111.1(2)		
C9-C10-H10A	109.5		
C9-C10-H10B	109.5		
H10A-C10-H10B	109.5		
C9-C10-H10C	109.5		
H10A-C10-H10C	109.5		
H10B-C10-H10C	109.5		
C9-C11-H11A	109.5		
C9-C11-H11B	109.5		
H11A-C11-H11B	109.5		
C9-C11-H11C	109.5		
H11A-C11-H11C	109.5		
H11B-C11-H11C	109.5		
C9-C12-H12A	109.5		
C9-C12-H12B	109.5		
H12A-C12-H12B	109.5		
C9-C12-H12C	109.5		
H12A-C12-H12C	109.5		
H12B-C12-H12C	109.5		
C8-N1-C4	123.18(19)		
C8-N1-C3	122.18(19)		

—
Symmetry transformations used to generate
equivalent atoms:

Table 4

Anisotropic displacement parameters (\AA^2) for chp027_0m_a.

The anisotropic displacement factor exponent takes the form: $-2\pi^2 [h^2 a^{*2} U^{11} + \dots + 2 h k a^* b^* U^{12}]$

	U ¹¹	U ²²	U ³³	U ²³	U ¹³	U ¹²
C1	0.0294(16)	0.0210(12)	0.0150(12)	-0.0031(12)	-0.0062(12)	-0.0043(11)
C2	0.0112(13)	0.0147(12)	0.0134(12)	-0.0020(10)	0.0001(9)	0.0025(10)
C3	0.0150(13)	0.0131(11)	0.0109(11)	-0.0005(10)	-0.0023(9)	0.0006(10)
C4	0.0117(12)	0.0079(10)	0.0139(11)	0.0017(9)	0.0007(10)	0.0013(10)
C5	0.0138(13)	0.0123(11)	0.0132(12)	-0.0004(10)	0.0004(10)	-0.0014(10)
C6	0.0092(12)	0.0115(11)	0.0154(12)	0.0019(10)	-0.0021(9)	-0.0004(9)
C7	0.051(2)	0.0217(13)	0.0124(12)	0.0041(11)	0.0089(13)	0.0059(13)
C8	0.0125(13)	0.0122(12)	0.0095(11)	-0.0034(10)	0.0032(9)	0.0012(10)
C9	0.0113(13)	0.0164(12)	0.0166(12)	-0.0038(10)	-0.0028(10)	-0.0024(10)
C10	0.0161(14)	0.0254(13)	0.0217(13)	-0.0092(12)	-0.0032(11)	0.0014(12)
C11	0.0193(15)	0.0292(15)	0.0191(12)	0.0013(12)	-0.0082(11)	-0.0027(12)
C12	0.0138(14)	0.0168(12)	0.0220(13)	-0.0026(11)	0.0025(10)	-0.0016(10)
N1	0.0137(11)	0.0120(10)	0.0114(9)	0.0030(8)	-0.0015(8)	-0.0032(9)
O1	0.0440(13)	0.0187(9)	0.0188(9)	0.0074(8)	0.0069(9)	0.0012(9)
O2	0.0258(11)	0.0342(10)	0.0227(10)	-0.0064(9)	0.0067(9)	0.0081(9)
O3	0.0135(9)	0.0154(8)	0.0115(7)	-0.0021(7)	-0.0004(7)	0.0033(7)
O4	0.0270(10)	0.0126(8)	0.0158(8)	0.0000(7)	0.0029(7)	0.0039(8)
O5	0.0335(12)	0.0117(8)	0.0112(8)	0.0023(7)	0.0032(8)	0.0036(8)
O6	0.0197(10)	0.0119(8)	0.0133(8)	0.0013(7)	0.0019(7)	-0.0032(7)
O7	0.0120(9)	0.0171(8)	0.0119(7)	0.0015(7)	-0.0036(6)	-0.0045(7)
S1	0.0221(3)	0.0161(3)	0.0101(3)	-0.0003(3)	0.0025(2)	0.0011(2)

Kristalldaten von Verbindung 18

Table 1

Crystal data

Identification code	chpmnprakt		
Habitus, colour	block, pale yellow		
Crystal size	0.490 x 0.243 x 0.185 mm ³		
Crystal system	Monoclinic		
Space group	P2 ₁	Z = 2	
Unit cell dimensions	a = 11.7613(9) Å	α = 90°.	
	b = 5.9773(5) Å	β = 100.642(3)°.	
	c = 12.7129(10) Å	γ = 90°.	
Volume	878.36(12) Å ³		
Cell determination	120 peaks with Theta 2.2 to 25.8°.		
Empirical formula	C17 H23 N O4 Se		
Formula weight	384.32		
Density (calculated)	1.453 Mg/m ³		
Absorption coefficient	2.156 mm ⁻¹		
F(000)	396		

Data collection:

Diffractometer type	Bruker D8 QUEST area detector
Wavelength	0.71073 Å
Temperature	100(2) K
Theta range for data collection	2.612 to 26.496°.
Index ranges	-14<=h<=14, -7<=k<=7, -15<=l<=15
Data collection software	BRUKER APEX II
Cell refinement software	BRUKER SAINT
Data reduction software	Bruker APEX II

Solution and refinement:

Reflections collected	14566
Independent reflections	3609 [R(int) = 0.0335]
Completeness to theta = 25.242°	99.7 %
Observed reflections	3502[I > 2(I)]
Reflections used for refinement	3609

Anhang

Absorption correction	Semi-empirical from equivalents
Flack parameter (absolute struct.)	-0.018(5)
Largest diff. peak and hole	0.907 and -0.351 e.Å ⁻³
Solution	direct / difmap
Refinement	Full-matrix least-squares on F ²
Treatment of hydrogen atoms	difmap , undef
Programs used	Bruker APEX II XT, VERSION 2014/5 SHELXL-2014 (Sheldrick, 2014) DIAMOND (Crystal Impact)
Data / restraints / parameters	3609 / 1 / 212
Goodness-of-fit on F ²	1.086
R index (all data)	wR2 = 0.0595
R index conventional [I>2sigma(I)]	R1 = 0.0246

Table 2

Atomic coordinates and equivalent isotropic displacement parameters (\AA^2)for chpmnprakt. $U(\text{eq})$ is defined as one third of the trace of the orthogonalized U^{ij} tensor.

	x	y	z	$U(\text{eq})$	Occupancy
C1	0.4653(3)	0.3986(5)	0.8359(3)	0.0140(6)	1
C2	0.4015(3)	0.7729(5)	0.8626(3)	0.0156(7)	1
C3	0.3046(3)	0.6186(5)	0.8805(3)	0.0150(6)	1
C4	0.3344(3)	0.3889(6)	0.8392(3)	0.0184(7)	1
C5	0.6086(3)	0.7038(7)	0.8793(2)	0.0144(7)	1
C6	0.8018(3)	0.5768(6)	0.8618(3)	0.0166(7)	1
C7	0.8710(3)	0.6963(7)	0.9583(3)	0.0199(8)	1
C8	0.8480(3)	0.3431(6)	0.8510(3)	0.0248(8)	1
C9	0.7980(3)	0.7092(9)	0.7583(2)	0.0217(7)	1
C10	0.4840(3)	0.3702(6)	0.7213(3)	0.0175(8)	1
C11	0.4800(4)	0.1000(7)	0.5844(3)	0.0341(10)	1
C12	0.1526(3)	0.6805(5)	0.6693(3)	0.0167(8)	1
C13	0.1066(3)	0.4830(6)	0.6212(3)	0.0225(7)	1
C14	0.1075(4)	0.4458(7)	0.5135(3)	0.0285(9)	1
C15	0.1531(4)	0.6048(8)	0.4545(3)	0.0313(9)	1
C16	0.1981(4)	0.8010(7)	0.5016(3)	0.0290(9)	1
C17	0.1973(3)	0.8404(6)	0.6094(3)	0.0219(7)	1
N1	0.5007(2)	0.6204(5)	0.8759(2)	0.0152(6)	1
O1	0.6336(2)	0.9000(4)	0.8872(2)	0.0184(5)	1
O2	0.6833(2)	0.5328(4)	0.8780(2)	0.0173(5)	1
O3	0.5117(2)	0.5131(4)	0.6651(2)	0.0242(6)	1
O4	0.4635(3)	0.1576(4)	0.6914(2)	0.0237(6)	1
Se1	0.15000(2)	0.73027(6)	0.81794(2)	0.01825(9)	1

Anhang

Table 3

Bond lengths [Å] and angles [°] for
chpmnprakt.

		C12-C17	1.385(5)
C1-N1	1.453(4)	C12-C13	1.392(5)
C1-C10	1.522(5)	C12-Se1	1.918(3)
C1-C4	1.549(5)	C13-C14	1.389(5)
C1-H1	1.0000	C13-H13	0.9500
C2-N1	1.465(4)	C14-C15	1.379(6)
C2-C3	1.516(4)	C14-H14	0.9500
C2-H2A	0.9900	C15-C16	1.377(6)
C2-H2B	0.9900	C15-H15	0.9500
C3-C4	1.533(5)	C16-C17	1.392(6)
C3-Se1	1.962(3)	C16-H16	0.9500
C3-H3	1.0000	C17-H17	0.9500
C4-H4A	0.9900		
C4-H4B	0.9900	N1-C1-C10	110.8(3)
C5-O1	1.209(5)	N1-C1-C4	104.2(3)
C5-O2	1.350(4)	C10-C1-C4	110.0(3)
C5-N1	1.357(4)	N1-C1-H1	110.6
C6-O2	1.470(4)	C10-C1-H1	110.6
C6-C8	1.515(5)	C4-C1-H1	110.6
C6-C7	1.520(5)	N1-C2-C3	102.1(2)
C6-C9	1.528(5)	N1-C2-H2A	111.4
C7-H7A	0.9800	C3-C2-H2A	111.4
C7-H7B	0.9800	N1-C2-H2B	111.4
C7-H7C	0.9800	C3-C2-H2B	111.4
C8-H8A	0.9800	H2A-C2-H2B	109.2
C8-H8B	0.9800	C2-C3-C4	105.5(3)
C8-H8C	0.9800	C2-C3-Se1	113.5(2)
C9-H9A	0.9800	C4-C3-Se1	114.8(2)
C9-H9B	0.9800	C2-C3-H3	107.6
C9-H9C	0.9800	C4-C3-H3	107.6
C10-O3	1.197(5)	Se1-C3-H3	107.6
C10-O4	1.336(4)	C3-C4-C1	105.5(3)
C11-O4	1.451(5)	C3-C4-H4A	110.6
C11-H11A	0.9800	C1-C4-H4A	110.6
C11-H11B	0.9800	C3-C4-H4B	110.6
C11-H11C	0.9800	C1-C4-H4B	110.6

Anhang

H4A-C4-H4B	108.8	C13-C12-Se1	119.3(3)
O1-C5-O2	125.9(3)	C14-C13-C12	119.7(3)
O1-C5-N1	124.8(3)	C14-C13-H13	120.1
O2-C5-N1	109.2(3)	C12-C13-H13	120.1
O2-C6-C8	102.3(3)	C15-C14-C13	120.0(4)
O2-C6-C7	110.6(3)	C15-C14-H14	120.0
C8-C6-C7	111.0(3)	C13-C14-H14	120.0
O2-C6-C9	109.6(3)	C16-C15-C14	120.5(4)
C8-C6-C9	110.7(3)	C16-C15-H15	119.8
C7-C6-C9	112.2(3)	C14-C15-H15	119.8
C6-C7-H7A	109.5	C15-C16-C17	120.0(4)
C6-C7-H7B	109.5	C15-C16-H16	120.0
H7A-C7-H7B	109.5	C17-C16-H16	120.0
C6-C7-H7C	109.5	C12-C17-C16	119.8(3)
H7A-C7-H7C	109.5	C12-C17-H17	120.1
H7B-C7-H7C	109.5	C16-C17-H17	120.1
C6-C8-H8A	109.5	C5-N1-C1	123.5(3)
C6-C8-H8B	109.5	C5-N1-C2	119.7(3)
H8A-C8-H8B	109.5	C1-N1-C2	110.9(3)
C6-C8-H8C	109.5	C5-O2-C6	120.2(3)
H8A-C8-H8C	109.5	C10-O4-C11	116.4(3)
H8B-C8-H8C	109.5	C12-Se1-C3	99.46(13)
C6-C9-H9A	109.5		
C6-C9-H9B	109.5		
H9A-C9-H9B	109.5		
C6-C9-H9C	109.5		
H9A-C9-H9C	109.5		
H9B-C9-H9C	109.5		
O3-C10-O4	124.4(3)		
O3-C10-C1	126.5(3)		
O4-C10-C1	109.1(3)		
O4-C11-H11A	109.5		
O4-C11-H11B	109.5		
H11A-C11-H11B	109.5		
O4-C11-H11C	109.5		
H11A-C11-H11C	109.5		
H11B-C11-H11C	109.5		
C17-C12-C13	120.0(3)		
C17-C12-Se1	120.8(2)		

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms:

Table 4

Anisotropic displacement parameters (\AA^2) for chp01050.The anisotropic displacement factor exponent takes the form: $-2\pi^2 [h^2 a^{*2} U^{11} + \dots + 2 h k a^* b^* U^{12}]$

	U^{11}	U^{22}	U^{33}	U^{23}	U^{13}	U^{12}
C1	0.0180(15)	0.0097(14)	0.0148(16)	-0.0008(12)	0.0043(12)	-0.0011(12)
C2	0.0177(14)	0.012(2)	0.0176(14)	-0.0007(12)	0.0032(12)	0.0012(12)
C3	0.0147(15)	0.0173(16)	0.0127(15)	0.0014(13)	0.0017(12)	0.0017(12)
C4	0.0193(16)	0.0133(15)	0.0231(18)	-0.0005(13)	0.0053(13)	-0.0011(13)
C5	0.0162(13)	0.017(2)	0.0099(12)	-0.0003(14)	0.0022(10)	0.0013(15)
C6	0.0175(16)	0.0143(15)	0.0193(17)	-0.0002(13)	0.0067(13)	-0.0017(13)
C7	0.0170(14)	0.024(2)	0.0187(14)	-0.0014(14)	0.0029(11)	-0.0029(14)
C8	0.0215(18)	0.0187(17)	0.037(2)	-0.0015(15)	0.0115(16)	0.0006(14)
C9	0.0242(15)	0.025(2)	0.0172(14)	0.0026(18)	0.0063(11)	0.0008(19)
C10	0.0218(17)	0.0135(16)	0.0170(18)	-0.0014(13)	0.0030(14)	-0.0023(13)
C11	0.058(3)	0.026(2)	0.024(2)	-0.0128(16)	0.0233(19)	-0.0157(19)
C12	0.0151(14)	0.018(2)	0.0159(15)	-0.0002(12)	0.0013(12)	0.0034(11)
C13	0.0251(18)	0.0198(18)	0.0209(18)	0.0015(14)	-0.0004(14)	-0.0016(14)
C14	0.035(2)	0.0239(19)	0.0231(19)	-0.0051(15)	-0.0038(16)	0.0018(16)
C15	0.041(2)	0.037(2)	0.0157(18)	-0.0061(17)	0.0052(17)	0.0046(19)
C16	0.038(2)	0.028(2)	0.0223(19)	0.0048(15)	0.0099(17)	-0.0017(15)
C17	0.0249(18)	0.0199(18)	0.0198(18)	-0.0014(14)	0.0013(15)	-0.0019(14)
N1	0.0168(14)	0.0102(13)	0.0182(14)	-0.0022(11)	0.0027(11)	-0.0004(11)
O1	0.0226(14)	0.0120(12)	0.0203(13)	-0.0027(10)	0.0030(11)	-0.0021(11)
O2	0.0181(13)	0.0106(11)	0.0241(13)	0.0002(10)	0.0060(11)	-0.0003(10)
O3	0.0404(15)	0.0168(12)	0.0166(12)	0.0021(10)	0.0080(11)	-0.0093(11)
O4	0.0429(17)	0.0139(13)	0.0183(13)	-0.0056(9)	0.0161(12)	-0.0091(10)
Se1	0.01646(14)	0.02242(15)	0.01677(15)	-0.00159(18)	0.00539(10)	0.00224(17)

Table 5

Hydrogen coordinates and isotropic displacement parameters (\AA^2) for chpmnprakt.

	x	y	z	U(eq)	Occupancy
H1	0.5083	0.2809	0.8832	0.017	1
H2A	0.3856	0.8387	0.7899	0.019	1
H2B	0.4140	0.8947	0.9163	0.019	1
H3	0.3086	0.6054	0.9595	0.018	1
H4A	0.2888	0.3604	0.7669	0.022	1
H4B	0.3181	0.2687	0.8879	0.022	1
H7A	0.8410	0.8484	0.9623	0.030	1
H7B	0.9525	0.7032	0.9512	0.030	1
H7C	0.8642	0.6143	1.0236	0.030	1
H8A	0.8463	0.2587	0.9168	0.037	1
H8B	0.9278	0.3521	0.8389	0.037	1
H8C	0.7998	0.2671	0.7904	0.037	1
H9A	0.7424	0.6396	0.7007	0.032	1
H9B	0.8749	0.7094	0.7391	0.032	1
H9C	0.7741	0.8635	0.7689	0.032	1
H11A	0.4237	0.1813	0.5316	0.051	1
H11B	0.4689	-0.0614	0.5731	0.051	1
H11C	0.5585	0.1410	0.5761	0.051	1
H13	0.0748	0.3742	0.6619	0.027	1
H14	0.0767	0.3108	0.4805	0.034	1
H15	0.1534	0.5788	0.3808	0.038	1
H16	0.2296	0.9095	0.4605	0.035	1
H17	0.2274	0.9765	0.6418	0.026	1

Table 6

Torsion angles [°] for chpmnprakt.

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms:

N1-C2-C3-C4	-31.8(3)
N1-C2-C3-Se1	-158.3(2)
C2-C3-C4-C1	19.1(3)
Se1-C3-C4-C1	144.9(2)
N1-C1-C4-C3	1.3(3)
C10-C1-C4-C3	-117.5(3)
N1-C1-C10-O3	-7.7(5)
C4-C1-C10-O3	107.0(4)
N1-C1-C10-O4	172.9(3)
C4-C1-C10-O4	-72.4(4)
C17-C12-C13-C14	1.0(5)
Se1-C12-C13-C14	179.7(3)
C12-C13-C14-C15	-0.4(6)
C13-C14-C15-C16	0.1(6)
C14-C15-C16-C17	-0.3(6)
C13-C12-C17-C16	-1.2(5)
Se1-C12-C17-C16	-179.8(3)
C15-C16-C17-C12	0.8(6)
O1-C5-N1-C1	161.4(3)
O2-C5-N1-C1	-21.8(4)
O1-C5-N1-C2	11.0(5)
O2-C5-N1-C2	-172.1(3)
C10-C1-N1-C5	-57.1(4)
C4-C1-N1-C5	-175.3(3)
C10-C1-N1-C2	95.6(3)
C4-C1-N1-C2	-22.7(3)
C3-C2-N1-C5	-171.5(3)
C3-C2-N1-C1	34.7(3)
O1-C5-O2-C6	-14.0(5)
N1-C5-O2-C6	169.1(3)
C8-C6-O2-C5	-172.7(3)
C7-C6-O2-C5	69.0(4)
C9-C6-O2-C5	-55.2(4)
O3-C10-O4-C11	1.9(6)
C1-C10-O4-C11	-178.6(3)

—

Kristalldaten von Verbindung 22

Table 1

Crystal data

Identification code	chp01050
Habitus, colour	needle, colorless
Crystal size	0.789 x 0.160 x 0.018 mm ³
Crystal system	Monoclinic
Space group	P2 ₁ Z = 4
Unit cell dimensions	a = 9.0857(5) Å $\alpha = 90^\circ$.
	b = 12.9140(5) Å $\beta = 104.212(3)^\circ$.
	c = 12.9884(6) Å $\gamma = 90^\circ$.
Volume	1477.32(12) Å ³
Cell determination	5495 peaks with 2Theta 4.518 to 50.02°.
Empirical formula	C13 H20 N2 O5
Formula weight	284.31
Density (calculated)	1.278 Mg/m ³
Absorption coefficient	0.098 mm ⁻¹
F(000)	608

Data collection:

Diffractometer type	Bruker D8 QUEST photon detector
Wavelength	0.71073 Å
Temperature	100(2) K
Theta range for data collection	2.259 to 25.294°.
Index ranges	-10 ≤ h ≤ 10, -15 ≤ k ≤ 15, -15 ≤ l ≤ 15
Data collection software	BRUKER APEX II
Cell refinement software	BRUKER SAINT
Data reduction software	Bruker APEX II

Solution and refinement:

Reflections collected	10688
Independent reflections	5166 [R(int) = 0.0459]

Anhang

Completeness to $\theta = 25.125^\circ$	99.9 %
Observed reflections	4347[$I > 2(I)$]
Reflections used for refinement	5166
Extinction coefficient	$X = 0.0116(18)$
Flack parameter (absolute struct.)	-0.4(6)
Largest diff. peak and hole	0.200 and -0.190 e. \AA^{-3}
Solution	direct / difmap
Refinement	Full-matrix least-squares on F^2
Treatment of hydrogen atoms	geom, mixed
Programs used	Bruker APEX2 SHELXL-2014 (Sheldrick, 2014) DIAMOND (Crystal Impact)
STOE IPDS2 software	
Data / restraints / parameters	5166 / 1 / 378
Goodness-of-fit on F^2	1.060
R index (all data)	wR2 = 0.0880
R index conventional [$I > 2\sigma(I)$]	R1 = 0.0463

Table 2

Atomic coordinates and equivalent isotropic displacement parameters (\AA^2) for chp01050.

U(eq) is defined as one third of the trace of the orthogonalized U_{ij} tensor.

	x	y	z	U(eq)	Occupancy
C3	0.4378(4)	0.5352(3)	0.5788(3)	0.0199(9)	1
C1	0.5837(4)	0.3997(3)	0.5365(3)	0.0172(8)	1
C2	0.5620(4)	0.4796(3)	0.6147(3)	0.0216(9)	1
C4	0.3537(4)	0.5026(3)	0.4690(3)	0.0161(8)	1
C6	0.3343(4)	0.5939(3)	0.3915(3)	0.0160(8)	1
C7	0.1620(4)	0.7101(3)	0.2750(3)	0.0199(9)	1
C8	0.2393(4)	0.6950(3)	0.1852(3)	0.0234(10)	1
C9	0.3712(5)	0.7770(4)	0.0748(4)	0.0370(11)	1
C10	0.4244(4)	0.3609(3)	0.3607(3)	0.0174(9)	1
C11	0.2260(4)	0.3240(3)	0.1998(3)	0.0199(9)	1
C12	0.0729(4)	0.3761(3)	0.1581(3)	0.0253(9)	1
C13	0.2063(5)	0.2132(3)	0.2332(3)	0.0263(10)	1
C14	0.3215(4)	0.3315(3)	0.1199(3)	0.0237(9)	1
C15	1.0769(4)	0.7247(3)	0.5751(3)	0.0193(9)	1

Anhang

C16	0.9627(4)	0.7882(3)	0.4984(3)	0.0246(9)	1
C17	0.8373(5)	0.7363(3)	0.4576(3)	0.0235(9)	1
C18	0.8470(4)	0.6259(3)	0.4967(3)	0.0164(8)	1
C19	0.8378(4)	0.5514(3)	0.4036(3)	0.0148(8)	1
C20	0.6738(4)	0.4878(3)	0.2419(3)	0.0191(8)	1
C21	0.7353(4)	0.5476(3)	0.1616(3)	0.0178(8)	1
C22	0.7815(5)	0.5399(4)	-0.0083(3)	0.0300(10)	1
C23	1.0272(4)	0.5518(3)	0.6481(3)	0.0158(8)	1
C24	1.2172(4)	0.5067(3)	0.8109(3)	0.0210(9)	1
C25	1.2420(4)	0.3956(3)	0.7800(3)	0.0270(10)	1
C26	1.1076(4)	0.5141(4)	0.8815(3)	0.0313(10)	1
C27	1.3672(4)	0.5574(3)	0.8632(3)	0.0296(10)	1
N1	0.4550(3)	0.4220(2)	0.4460(2)	0.0148(7)	1
N2	0.1928(3)	0.6238(2)	0.3488(2)	0.0173(7)	1
N3	0.9941(3)	0.6257(2)	0.5725(2)	0.0162(7)	1
N4	0.6994(4)	0.5403(3)	0.3417(2)	0.0187(7)	1
O1	0.4449(3)	0.63889(19)	0.3717(2)	0.0207(6)	1
O2	0.2477(4)	0.6151(2)	0.1406(2)	0.0406(8)	1
O3	0.2946(3)	0.7850(2)	0.1589(2)	0.0270(7)	1
O4	0.5091(3)	0.29106(19)	0.3462(2)	0.0214(6)	1
O5	0.2923(3)	0.38736(19)	0.29364(19)	0.0190(6)	1
O6	0.9500(2)	0.51046(19)	0.38427(19)	0.0178(6)	1
O7	0.7277(3)	0.49030(19)	0.07483(19)	0.0223(6)	1
O8	0.7812(3)	0.6355(2)	0.1713(2)	0.0283(7)	1
O9	0.9448(3)	0.47814(19)	0.6524(2)	0.0195(6)	1
O10	1.1626(3)	0.57094(19)	0.71576(18)	0.0186(6)	1

Anhang

Table 3

Bond lengths [Å] and angles [°] for chp01050.

C3-C2	1.322(5)	C14-H14B	0.9800
C3-C4	1.503(5)	C14-H14C	0.9800
C3-H3	0.9500	C15-N3	1.480(5)
C1-N1	1.468(4)	C15-C16	1.495(5)
C1-C2	1.495(5)	C15-H15A	0.9900
C1-H1A	0.9900	C15-H15B	0.9900
C1-H1B	0.9900	C16-C17	1.316(5)
C2-H2	0.9500	C16-H16	0.9500
C4-N1	1.468(4)	C17-C18	1.509(5)
C4-C6	1.532(5)	C17-H17	0.9500
C4-H4	1.0000	C18-N3	1.453(4)
C6-O1	1.241(4)	C18-C19	1.532(5)
C6-N2	1.327(4)	C18-H18	1.0000
C7-N2	1.451(5)	C19-O6	1.227(4)
C7-C8	1.515(6)	C19-N4	1.323(4)
C7-H7A	0.9900	C20-N4	1.431(5)
C7-H7B	0.9900	C20-C21	1.511(5)
C8-O2	1.195(5)	C20-H20A	0.9900
C8-O3	1.342(5)	C20-H20B	0.9900
C9-O3	1.436(5)	C21-O8	1.205(5)
C9-H9A	0.9800	C21-O7	1.335(4)
C9-H9B	0.9800	C22-O7	1.441(4)
C9-H9C	0.9800	C22-H22A	0.9800
C10-O4	1.230(4)	C22-H22B	0.9800
C10-N1	1.333(5)	C22-H22C	0.9800
C10-O5	1.343(4)	C23-O9	1.220(4)
C11-O5	1.469(4)	C23-O10	1.348(4)
C11-C14	1.510(6)	C23-N3	1.348(5)
C11-C13	1.519(5)	C24-O10	1.470(4)
C11-C12	1.520(5)	C24-C26	1.512(5)
C12-H12A	0.9800	C24-C27	1.514(5)
C12-H12B	0.9800	C24-C25	1.522(6)
C12-H12C	0.9800	C25-H25A	0.9800
C13-H13A	0.9800	C25-H25B	0.9800
C13-H13B	0.9800	C25-H25C	0.9800
C13-H13C	0.9800	C26-H26A	0.9800
C14-H14A	0.9800	C26-H26B	0.9800

Anhang

C26-H26C	0.9800	O3-C9-H9C	109.5
C27-H27A	0.9800	H9A-C9-H9C	109.5
C27-H27B	0.9800	H9B-C9-H9C	109.5
C27-H27C	0.9800	O4-C10-N1	123.4(3)
N2-H02	0.86(4)	O4-C10-O5	125.5(3)
N4-H04	0.77(4)	N1-C10-O5	111.1(3)
C2-C3-C4	111.9(3)	O5-C11-C14	110.3(3)
C2-C3-H3	124.0	O5-C11-C13	109.9(3)
C4-C3-H3	124.0	C14-C11-C13	112.6(3)
N1-C1-C2	101.4(3)	O5-C11-C12	101.7(3)
N1-C1-H1A	111.5	C14-C11-C12	110.9(3)
C2-C1-H1A	111.5	C13-C11-C12	110.9(3)
N1-C1-H1B	111.5	C11-C12-H12A	109.5
C2-C1-H1B	111.5	C11-C12-H12B	109.5
H1A-C1-H1B	109.3	H12A-C12-H12B	109.5
C3-C2-C1	112.2(3)	C11-C12-H12C	109.5
C3-C2-H2	123.9	H12A-C12-H12C	109.5
C1-C2-H2	123.9	H12B-C12-H12C	109.5
N1-C4-C3	101.2(3)	C11-C13-H13A	109.5
N1-C4-C6	112.8(3)	C11-C13-H13B	109.5
C3-C4-C6	110.9(3)	H13A-C13-H13B	109.5
N1-C4-H4	110.5	C11-C13-H13C	109.5
C3-C4-H4	110.5	H13A-C13-H13C	109.5
C6-C4-H4	110.5	H13B-C13-H13C	109.5
O1-C6-N2	121.9(3)	C11-C14-H14A	109.5
O1-C6-C4	121.9(3)	C11-C14-H14B	109.5
N2-C6-C4	116.2(3)	H14A-C14-H14B	109.5
N2-C7-C8	111.0(3)	C11-C14-H14C	109.5
N2-C7-H7A	109.4	H14A-C14-H14C	109.5
C8-C7-H7A	109.4	H14B-C14-H14C	109.5
N2-C7-H7B	109.4	N3-C15-C16	101.1(3)
C8-C7-H7B	109.4	N3-C15-H15A	111.5
H7A-C7-H7B	108.0	C16-C15-H15A	111.5
O2-C8-O3	123.5(4)	N3-C15-H15B	111.5
O2-C8-C7	125.5(4)	C16-C15-H15B	111.5
O3-C8-C7	111.0(3)	H15A-C15-H15B	109.4
O3-C9-H9A	109.5	C17-C16-C15	112.3(3)
O3-C9-H9B	109.5	C17-C16-H16	123.8
H9A-C9-H9B	109.5	C15-C16-H16	123.8

Anhang

C16-C17-C18	111.9(3)	C24-C25-H25C	109.5
C16-C17-H17	124.1	H25A-C25-H25C	109.5
C18-C17-H17	124.1	H25B-C25-H25C	109.5
N3-C18-C17	101.4(3)	C24-C26-H26A	109.5
N3-C18-C19	113.4(3)	C24-C26-H26B	109.5
C17-C18-C19	109.9(3)	H26A-C26-H26B	109.5
N3-C18-H18	110.6	C24-C26-H26C	109.5
C17-C18-H18	110.6	H26A-C26-H26C	109.5
C19-C18-H18	110.6	H26B-C26-H26C	109.5
O6-C19-N4	122.9(3)	C24-C27-H27A	109.5
O6-C19-C18	123.0(3)	C24-C27-H27B	109.5
N4-C19-C18	114.0(3)	H27A-C27-H27B	109.5
N4-C20-C21	112.2(3)	C24-C27-H27C	109.5
N4-C20-H20A	109.2	H27A-C27-H27C	109.5
C21-C20-H20A	109.2	H27B-C27-H27C	109.5
N4-C20-H20B	109.2	C10-N1-C1	120.8(3)
C21-C20-H20B	109.2	C10-N1-C4	125.2(3)
H20A-C20-H20B	107.9	C1-N1-C4	113.0(3)
O8-C21-O7	123.8(4)	C6-N2-C7	120.6(3)
O8-C21-C20	125.9(4)	C6-N2-H02	119(3)
O7-C21-C20	110.3(3)	C7-N2-H02	120(3)
O7-C22-H22A	109.5	C23-N3-C18	119.9(3)
O7-C22-H22B	109.5	C23-N3-C15	125.0(3)
H22A-C22-H22B	109.5	C18-N3-C15	113.1(3)
O7-C22-H22C	109.5	C19-N4-C20	121.3(3)
H22A-C22-H22C	109.5	C19-N4-H04	124(3)
H22B-C22-H22C	109.5	C20-N4-H04	114(3)
O9-C23-O10	125.8(3)	C8-O3-C9	114.4(3)
O9-C23-N3	123.7(3)	C10-O5-C11	121.1(3)
O10-C23-N3	110.5(3)	C21-O7-C22	115.4(3)
O10-C24-C26	109.7(3)	C23-O10-C24	120.7(3)
O10-C24-C27	102.4(3)		
C26-C24-C27	110.8(3)	<hr/> Symmetry transformations used to generate equivalent atoms:	
O10-C24-C25	110.6(3)		
C26-C24-C25	112.4(3)		
C27-C24-C25	110.5(3)		
C24-C25-H25A	109.5		
C24-C25-H25B	109.5		
H25A-C25-H25B	109.5		

Table 4

Anisotropic displacement parameters (\AA^2) for chp01050.The anisotropic displacement factor exponent takes the form: $-2\pi^2 [h^2 a^{*2} U^{11} + \dots + 2 h k a^* b^* U^{12}]$

	U^{11}	U^{22}	U^{33}	U^{23}	U^{13}	U^{12}
C3	0.021(2)	0.019(2)	0.021(2)	-0.0011(18)	0.0071(16)	-0.0012(16)
C1	0.0176(18)	0.016(2)	0.016(2)	0.0010(18)	0.0007(16)	-0.0005(16)
C2	0.022(2)	0.024(2)	0.017(2)	0.0004(18)	0.0020(16)	-0.0033(17)
C4	0.0133(16)	0.0141(18)	0.022(2)	-0.0023(18)	0.0072(15)	-0.0028(16)
C6	0.017(2)	0.0123(18)	0.020(2)	-0.0073(16)	0.0060(17)	-0.0024(16)
C7	0.0181(19)	0.0112(19)	0.027(2)	0.0011(18)	-0.0004(18)	0.0016(16)
C8	0.026(2)	0.018(2)	0.021(2)	0.0035(19)	-0.0049(19)	-0.0031(17)
C9	0.050(3)	0.026(2)	0.041(3)	0.009(2)	0.022(2)	-0.004(2)
C10	0.0172(19)	0.0139(19)	0.022(2)	0.0029(18)	0.0063(17)	-0.0015(16)
C11	0.020(2)	0.018(2)	0.019(2)	-0.0015(17)	-0.0018(17)	-0.0048(16)
C12	0.023(2)	0.025(2)	0.025(2)	-0.0006(19)	0.0006(18)	-0.0040(18)
C13	0.033(2)	0.019(2)	0.025(2)	-0.0012(19)	0.004(2)	-0.0070(18)
C14	0.031(2)	0.016(2)	0.022(2)	-0.0009(18)	0.0016(18)	-0.0071(17)
C15	0.028(2)	0.0117(19)	0.019(2)	-0.0013(17)	0.0063(18)	-0.0039(16)
C16	0.038(2)	0.013(2)	0.022(2)	0.0021(18)	0.0063(19)	0.0007(18)
C17	0.033(2)	0.016(2)	0.021(2)	0.0026(18)	0.0044(19)	0.0074(18)
C18	0.0168(18)	0.0158(19)	0.016(2)	0.0016(17)	0.0025(16)	0.0009(16)
C19	0.0141(19)	0.0104(18)	0.021(2)	0.0042(17)	0.0065(16)	-0.0033(15)
C20	0.0159(18)	0.022(2)	0.018(2)	-0.0044(18)	0.0015(15)	-0.0029(16)
C21	0.0120(18)	0.022(2)	0.017(2)	0.0009(19)	-0.0011(15)	0.0026(16)
C22	0.035(2)	0.035(3)	0.023(2)	0.002(2)	0.0140(19)	-0.004(2)
C23	0.0188(19)	0.0140(19)	0.0152(19)	-0.0022(17)	0.0055(15)	0.0016(16)
C24	0.0197(19)	0.025(2)	0.0154(19)	0.0023(18)	-0.0012(16)	0.0042(17)
C25	0.021(2)	0.026(2)	0.031(2)	0.005(2)	0.0000(18)	0.0031(18)
C26	0.028(2)	0.048(3)	0.017(2)	0.009(2)	0.0029(17)	0.010(2)
C27	0.027(2)	0.035(2)	0.022(2)	-0.003(2)	-0.0050(18)	0.0040(19)
N1	0.0160(16)	0.0116(16)	0.0152(17)	-0.0001(13)	0.0007(13)	0.0017(12)
N2	0.0127(17)	0.0149(17)	0.0239(18)	0.0006(15)	0.0038(14)	-0.0004(14)
N3	0.0195(16)	0.0112(15)	0.0160(16)	0.0019(14)	0.0006(13)	-0.0045(13)
N4	0.0120(17)	0.0216(18)	0.0226(18)	-0.0025(16)	0.0046(15)	0.0013(14)
O1	0.0155(13)	0.0157(14)	0.0321(16)	0.0036(13)	0.0082(12)	0.0007(11)
O2	0.080(2)	0.0166(16)	0.0292(17)	-0.0068(14)	0.0213(17)	-0.0134(16)
O3	0.0312(15)	0.0155(14)	0.0355(17)	0.0051(13)	0.0106(13)	-0.0016(12)

Anhang

O4	0.0238(14)	0.0137(14)	0.0254(15)	0.0001(12)	0.0034(12)	0.0057(12)
O5	0.0195(13)	0.0148(13)	0.0189(14)	-0.0024(12)	-0.0026(11)	0.0008(11)
O6	0.0119(12)	0.0165(14)	0.0258(14)	-0.0010(12)	0.0063(11)	-0.0009(11)
O7	0.0298(14)	0.0206(15)	0.0185(14)	-0.0026(13)	0.0097(11)	-0.0056(12)
O8	0.0386(16)	0.0177(16)	0.0281(16)	0.0005(13)	0.0074(13)	-0.0069(13)
O9	0.0200(13)	0.0152(14)	0.0224(14)	0.0036(12)	0.0030(11)	-0.0012(11)
O10	0.0165(13)	0.0199(14)	0.0165(14)	0.0021(12)	-0.0015(11)	-0.0019(11)

Table 5

Hydrogen coordinates and isotropic displacement parameters (\AA^2) for chp01050.

	x	y	z	U(eq)	Occupancy
H3	0.4056	0.5893	0.6177	0.024	1
H1A	0.6819	0.4088	0.5174	0.021	1
H1B	0.5778	0.3287	0.5639	0.021	1
H2	0.6296	0.4892	0.6825	0.026	1
H4	0.2527	0.4725	0.4701	0.019	1
H7A	0.1987	0.7750	0.3133	0.024	1
H7B	0.0511	0.7165	0.2455	0.024	1
H9A	0.4549	0.7273	0.0950	0.056	1
H9B	0.4115	0.8450	0.0623	0.056	1
H9C	0.2995	0.7532	0.0099	0.056	1
H12A	0.0134	0.3709	0.2114	0.038	1
H12B	0.0183	0.3418	0.0925	0.038	1
H12C	0.0884	0.4492	0.1435	0.038	1
H13A	0.3062	0.1808	0.2583	0.039	1
H13B	0.1466	0.1743	0.1724	0.039	1
H13C	0.1533	0.2130	0.2905	0.039	1
H14A	0.3391	0.4045	0.1061	0.035	1
H14B	0.2683	0.2979	0.0535	0.035	1
H14C	0.4191	0.2969	0.1482	0.035	1
H15A	1.1714	0.7157	0.5510	0.023	1
H15B	1.1017	0.7556	0.6471	0.023	1
H16	0.9787	0.8581	0.4812	0.029	1
H17	0.7511	0.7649	0.4093	0.028	1
H18	0.7643	0.6110	0.5332	0.020	1
H20A	0.5634	0.4769	0.2135	0.023	1
H20B	0.7230	0.4189	0.2528	0.023	1
H22A	0.7153	0.5985	-0.0365	0.045	1
H22B	0.7806	0.4901	-0.0654	0.045	1
H22C	0.8853	0.5650	0.0204	0.045	1
H25A	1.1448	0.3654	0.7424	0.040	1
H25B	1.2850	0.3551	0.8442	0.040	1
H25C	1.3124	0.3948	0.7337	0.040	1
H26A	1.0959	0.5868	0.8997	0.047	1

Anhang

H26B	1.1472	0.4742	0.9466	0.047	1
H26C	1.0088	0.4861	0.8439	0.047	1
H27A	1.4373	0.5502	0.8171	0.044	1
H27B	1.4107	0.5236	0.9315	0.044	1
H27C	1.3507	0.6310	0.8750	0.044	1
H02	0.119(5)	0.586(3)	0.359(3)	0.033(13)	1
H04	0.628(4)	0.566(3)	0.353(3)	0.011(11)	1

Anhang

Table 6

Torsion angles [°] for chp01050

C4-C3-C2-C1	-0.2(5)	C17-C18-N3-C23	160.1(3)
N1-C1-C2-C3	2.9(4)	C19-C18-N3-C23	-82.2(4)
C2-C3-C4-N1	-2.7(4)	C17-C18-N3-C15	-4.4(4)
C2-C3-C4-C6	-122.6(3)	C19-C18-N3-C15	113.3(3)
N1-C4-C6-O1	-50.7(4)	C16-C15-N3-C23	-160.2(3)
C3-C4-C6-O1	62.0(4)	C16-C15-N3-C18	3.3(4)
N1-C4-C6-N2	130.9(3)	O6-C19-N4-C20	-6.5(5)
C3-C4-C6-N2	-116.4(3)	C18-C19-N4-C20	169.4(3)
N2-C7-C8-O2	40.6(5)	C21-C20-N4-C19	-68.4(4)
N2-C7-C8-O3	-141.3(3)	O2-C8-O3-C9	-2.4(5)
N3-C15-C16-C17	-0.6(4)	C7-C8-O3-C9	179.4(3)
C15-C16-C17-C18	-2.2(5)	O4-C10-O5-C11	8.1(5)
C16-C17-C18-N3	4.0(4)	N1-C10-O5-C11	-173.1(3)
C16-C17-C18-C19	-116.2(4)	C14-C11-O5-C10	-68.8(4)
N3-C18-C19-O6	-12.7(5)	C13-C11-O5-C10	55.9(4)
C17-C18-C19-O6	99.9(4)	C12-C11-O5-C10	173.5(3)
N3-C18-C19-N4	171.4(3)	O8-C21-O7-C22	1.1(5)
C17-C18-C19-N4	-76.0(4)	C20-C21-O7-C22	179.2(3)
N4-C20-C21-O8	-10.3(5)	O9-C23-O10-C24	-6.5(5)
N4-C20-C21-O7	171.7(3)	N3-C23-O10-C24	174.2(3)
O4-C10-N1-C1	-8.8(5)	C26-C24-O10-C23	-60.6(4)
O5-C10-N1-C1	172.3(3)	C27-C24-O10-C23	-178.3(3)
O4-C10-N1-C4	-176.7(3)	C25-C24-O10-C23	64.0(4)
O5-C10-N1-C4	4.4(5)		
C2-C1-N1-C10	-174.0(3)		
C2-C1-N1-C4	-4.8(4)		
C3-C4-N1-C10	173.3(3)		
C6-C4-N1-C10	-68.1(4)		
C3-C4-N1-C1	4.7(4)		
C6-C4-N1-C1	123.3(3)		
O1-C6-N2-C7	1.1(5)		
C4-C6-N2-C7	179.5(3)		
C8-C7-N2-C6	53.0(4)		
O9-C23-N3-C18	6.3(5)		
O10-C23-N3-C18	-174.3(3)		
O9-C23-N3-C15	168.8(3)		
O10-C23-N3-C15	-11.8(5)		

Table 7

Hydrogen bonds for chp01050 [\AA and $^\circ$].

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	$\angle(\text{DHA})$
N2-H02...O6#1	0.86(4)	1.92(4)	2.779(4)	176(4)
N4-H04...O1	0.77(4)	1.98(4)	2.750(4)	175(4)

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms:

#1 $x-1, y, z$

Danksagung

Abschließend möchte ich mich bei allen Bedanken, die mich während meiner Promotion begleitet und unterstützt haben und zum erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit beigetragen haben.

Jun.-Prof. Dr. OLALLA VÁZQUEZ danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Prof. Dr. CARSTEN VON HÄNISCH danke ich für die Bereitschaft, der Prüfungskommission anzugehören.

Den Mitarbeitern der NMR-Abteilung Dr. XIULAN XIE, Dr. RONALD WAGNER, GERT HÄDE und CORNELIA MISCHKE möchte ich für die Durchführung vieler Hochfeldmessungen (Besonders meiner vielen Temperaturreihen), sowie der Möglichkeit zur Selbstmessung am AV 600 und der Hilfestellungen danken.

Bei den Mitarbeitern der massenspektrometrischen Abteilung Dr. UWE LINNE, JAN BAMBERGER, ANNE-LENA HEMER und TINA KRIEG möchte ich mich die Aufnahme der vielen Massenspektren und Durchführung der LC-MS-Messungen bedanken.

Unser Kooperationspartnerin Dr. MARINA BERDITSCH auf der Arbeitsgruppe ULRICH (Karlsruher Institut für Technologie) möchte ich mich für die Bestimmung der MHK-Werte und der hämolytischen Aktivität der Gramicidin S-Derivate, sowie der Bereitstellung von natürlichem Gramicidin S zu Vergleichszwecken bedanken.

JAN GEBAUER aus der Arbeitsgruppe BAUMANN (Universität Köln) danke ich für die Kristallisation meiner Peptide und der Messungen am Synchrotron.

Ein besonderer Dank gilt der guten Seele des Arbeitskreises, SUSANNE SCHELLENBERG. Ihre organisatorische Arbeit hat mich und den Arbeitskreis viele Male vor vollkommenem Chaos gerettet.

Meinen Vertiefen MAGDALENA SCHARF, MICHAEL KRYBUS, TOM GALLINGER und FLORIAN TAUBE danke ich für ihre motivierte Mitarbeit.

Allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern des Arbeitskreises GEYER möchte ich für die gemeinsame Zeit bedanken.

Danksagung

Dr. MARYNA ABACILAR danke für die offenen und direkten Diskussionen. Ich hoffe du pflegst dein Klassenzimmer genauso wie unseren Kaffeeraum (welcher dich, dem Zustand zu urteilen, vermisst).

Dr. CARSTEN AUER danke ich für seine (fachbereichsweite) Hilfsbereitschaft, den Diskussionen beim täglichen Kaffee, sowie den Geschichten aus dem Fachbereich längst vergangener Tage.

FABIAN DAUS, dem amtierenden Herr über die HPLC, danke ich für die vielen chemischen und vor allem nicht chemischen Diskussionen. Ich hoffe, dass du eines Tages das Silaffin in den Händen hältst, spätestens wenn Schalke Meister wird.

PHILLIP HORX, der auch als Imitator auftreten könnte, wünsche ich weiterhin viel Erfolg beim zappeln-lassen verschiedenster Moleküle.

MAXIMILIAN JUNG, danke ich für seine, zuweilen aufopferungsvolle, Hilfsbereitschaft in wichtigen und unwichtigen Dingen des Lebens. Vielleicht findest du auch eines Tages ohne Navi nach Hause.

DENNIS KLEE danke ich für seine stets direkte und ermutigende Wortwahl und wünsche dir noch viel Erfolg bei deiner Promotion.

Dr. ROMINA KIRSCHNER möchte ich für die über weite Strecken hervorragende Bewirtung des Arbeitskreises mit allerhand Backwaren bedanken.

Unserer Leiterprüferin MICHELLE KRÜGER danke ich für ihre offene und direkte Art, welche stets gute Laune (oder völliges Entsetzen) verbreitet hat.

Dr. STEFAN LENZ danke ich für die vielen Diskussionen in der Mittagsrunde und seiner stetigen Bereitschaft dafür zu sorgen, dass der Synthie glüht. Nicht zu vergessen ist auch der ständige Nachschub an Getränken (normaler und alkoholsicher Natur).

LENNART NICKE danke ich für den nicht, oder nur selten, abreißenden Nachschub an lebenswichtigem Heißgetränk, ohne den kein Arbeitskreis dieser Welt zur Forschung in der Lage wäre.

Dr. JAN REUTZEL möchte ich für das Instanthalten der digitalen Infrastruktur sowie das Umgestalten des Labors in ein Atelier der modernen Internetkultur danken.

Danksagung

Dr. ANDREAS SCHRIMPF danke ich für die vielen sinnvollen, aber auch sinnbefreiten Diskussionen und seiner selbstironischen Art. Ich hoffe, dass dir dies auch auf deiner Beamtenlaufbahn erhalten bleibt.

ANDRÉ SCHMIEGEL danke ich für die ausgiebigen Gespräche über diverseste Sportarten. Ich hoffe, dass deine Trainertätigkeit neue Verletzungen verhindert und auch du in den Genuss kommst, einen Halbmarathon schneller als der Chef zu laufen.

Dr. ANDRÉ WUTTKE, Großmeister der HPLC, danke ich für die gemeinsame Zeit im Labor und die vielen Unterhaltungen über Chemie, Gott und die Welt. Die letzten zwei Jahre waren hier im Labor (abseits der Chemie) deutlich langweiliger.

Ganz besonders möchte ich JÖRN MÜNZER, MARKUS BALMER und GRÉGOIRE SIEG danken. Ohne euch wären die letzten 9 Jahre nicht ansatzweise so lustig gewesen. Ich hoffe, dass wir unsere sonntägliche Zusammenkunft in den Wintermonaten noch lange Zeit zelebrieren können.

An dieser Stelle möchte ich auch noch allen Danken, die mich in den Jahren hier bei diversen sportlichen Aktivitäten begleitet haben. Euch alle aufzuzählen würde zu lange dauern.

Der Abschließende und ganz besondere Dank geht an meine Familie. Ohne euch würde ich hier nicht stehen!

Erklärung

Ich, Christoph Priem, erkläre, dass eine Promotion noch an keiner anderen Hochschule als der Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Chemie, versucht wurde.

Ich versichere, dass ich meine vorgelegte Dissertation

„Eigenschaften *late-stage*-modifizierter Kollagen-Modellpeptide“

selbst und ohne fremde Hilfe verfasst, nicht andere als die in ihr angegebenen Quellen oder Hilfsmittel benutzt, alle vollständig oder sinngemäß übernommenen Zitate als solche gekennzeichnet, sowie die Dissertation in der vorliegenden oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen in- oder ausländischen Hochschule anlässlich eines Promotionsgesuchs oder zu anderen Prüfungszwecken eingereicht habe.

Marburg, 02.10.2019

Christoph Priem